

THÈSE

Présentée à

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : Sciences de la Terre

Détection d'ADN par spectroscopie SERRS et interactions entre nucléotides et surfaces des minéraux phyllosilicatés ferromagnésiens dans le contexte de l'origine de la Vie

par

Cécile FEUILLIE

Soutenance publique le 28 septembre 2012

JURY :

Sophie Lecomte
Dimitri Sverjensky
Stephen Mojzsis
Bertrand Fourcade
Laurent Michot
Catherine Hänni
Isabelle Daniel

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Remerciements

Soyons réalistes, les remerciements sont les seules pages qui seront lues par plus de 3 personnes ! donc merci à toi lecteur si tu dépasses ces quelques pages de remerciements.

Tout d'abord, je souhaite adresser un grand merci à Isabelle Daniel pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, et pour m'avoir encadrée au cours de ces 4 années de thèse. J'ai beaucoup appris et je t'en remercie. Merci pour ta disponibilité, ta patience et tes encouragements, et merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ces 2 projets.

Merci également à Catherine Hänni de m'avoir ouvert les portes du laboratoire de paléogénétique de l'IGFL, et de m'avoir fait découvrir cette discipline. Merci pour ton soutien tout au long de cette thèse !

Merci à Laurent Michot de m'avoir initiée à de nouveaux concepts et techniques au sein du laboratoire Environnement et Minéralurgie de Nancy, et pour son soutien !

Isabelle, Catherine, Laurent, merci à tous les 3 pour votre gentillesse !

L'interdisciplinarité aura été la pierre angulaire de ma thèse, et restera une facette essentielle du travail de chercheur à mes yeux.

Je souhaite également remercier les autres membres du jury : merci à Me Sophie Lecomte et Mr Dimitri Sverjensky pour avoir accepté de relire ce travail, ainsi que pour leurs conseils et remarques avisés. Merci également à Bertrand Fourcade d'avoir évalué mon travail en tant qu'examineur, et merci enfin à Stephen Mojzsis d'avoir accepté de présider ce jury de soutenance.

Au cours de ce travail, j'ai pu collaborer avec moult scientifiques.

Labo de Géologie

Merci à toute l'équipe de minéralogie, en particulier Gilles Montagnac et Hervé Cardon pour leur assistance au Raman. Merci à Elodie Amiguet pour les échantillons. Merci à Phil Oger, Margaux Meslé, Anaïs Cario et Charlotte Perrier pour la partie bio mol.

Merci à Ulysse Pedreira-Segade, que j'ai eu la chance d'encadrer au cours de son stage de licence.

Labo de Paléo

Merci à Benjamin Gillet, pour m'avoir aidée dans les manips de biologie moléculaire, et pour ses conseils quant à la rédaction des papiers. Merci à l'équipe de paléogénétique Sandrine Hughes, et Marylin Dufraisse pour leur assistance.

Je remercie également Maxime Mohamed Merheb, binôme de la première partie de cette thèse ! Merci à Morgane Ollivier-Ruz pour nos discussions scientifiques ou non !

Labo Environnement et Minéralurgie

Merci à toute l'équipe pour leur aide : Angelina Razafitianamaharavo (mesures BET et facteur de forme), Isabelle Bihannic et Lise Salsi (DRX), Renaud Gley (CEC et

centrifugeuse), Odile Barres (IR), Céline Caillet et Yves Waldvogel (potentiel Zeta), Pabla Antonini (beidellite), Emmanuelle Montargès-Pelletier.

Mais il n'y a pas que le travail dans la vie !

Mes cobureaux et assimilés méritent de graaaaands remerciements, on a passé de très bonnes années au labo et en dehors du labo, et cette ambiance sera dure, et je pense même impossible, à re créer ailleurs! Merci à Jessica « Poule », Klervia, Ange, Martin, Emilie et Arthur (cobureaux assimilés), Marie-Laure, Lucile, Tristan, Romain (Basset), Marine, Romain (Bouchet), Margaux, Anais, Thomas, Baptiste, Bertrand, Manue, Laurent et j'en oublie sûrement, mais je les remercie qd même !

Merci pour les soirées singstar, pour les watching group et les pauses gouter, pour les nanards, pour les fêtes du nouvel an et les bals des pompiers, pour les soirées déguisées, pour les week end canoë, pour les bières au foyer, pour les sessions badminton, pour l'ambiance générale entre thésards...

Merci à mes colocos de la licence à la fin de thèse, Jess, Klervia, Greg, Amandine, Lucile et Ange (hihi), on a bien rigolé et vivre avec vous a rendu la vie plus douce. Aurore, merci aussi d'avoir été là depuis le master, on n'a pas vécu ensemble mais on a bien rigolé ☺

Mes amis extérieur à Lyon ne sont pas en reste : Sido, merci beaucoup d'avoir été là tout du long depuis le CM2! Merci pour les week end à Clermont, les week end alsaciens, les week end lyonnais, rigolade et bonne musique, on a papoté des choses importantes et de tout et de rien. William, merci de nous laisser être débiles qd on se voit ! Guillaume « Gom », merci pour les week end endiablés où on chantait du Émile et Images, ça fait partie de la BO de ma thèse.

Du fond du cœur je remercie ma famille. Ce n'est pas évident d'avoir une fille / sœur en thèse, par exemple, quand à la question « ça marche ? » je répondais « non » pour la 12000^e fois. Ou quand pendant la rédaction de ce manuscrit, on me demandait si j'avais bien avancé et que je leur sautais à la gorge... Ils sont les meilleurs coachs et équipe de soutien du monde : merci donc à mes parents Jacqueline et Claude et à ma sœur chérie adorée Claire. Merci aussi au reste de ma famille en entier, oncles, tantes, cousins cousines, c'est agréable de se savoir soutenu ! une petite pensée également pour mes grand-mères, j'aurais aimé qu'elles me voient soutenir ma thèse...

Pour finir, Ange, tu ne t'en rends peut être pas compte, mais je n'aurais pas pu finir sereinement sans toi. Merci pour tout.

Sommaire

Liste des abréviations	7
INTRODUCTION GENERALE	8

PARTIE 1

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....13

I. Notion d'archéologie moléculaire	13
I.1. Fossiles moléculaires	13
I.2. Les polysaccharides	14
I.3. Les lipides	15
I.4. Les acides aminés et protéines	17
I.5. Les acides nucléiques.....	18
II. Paléogénétique et analyse d'ADN ancien et/ou dégradé	21
I.1. Caractéristiques / Taphonomie de l'ADN ancien	21
I.2. Débuts de la paléogénétique	24
I.3. Emergence de la PCR et essor de la paléogénétique	25
I.4. Séquençage haut débit	27
I.4.1. Séquençage de deuxième génération	28
I.4.2. Séquençage de molécules uniques	30
I.5. Limitations des ADN polymérases	31
I.5.1. Présence d'inhibiteurs	31
I.5.2. Contamination	32
I.5.3. Incapacité à traiter certaines lésions	33
III. Peut-on s'affranchir des limitations enzymatiques ?	37
III.1. Fragmentation.....	37
III.2. Crosslinks	37
III.3. Réparation enzymatique de l'ADN	38
III.4. De nouvelles enzymes plus performantes	41
IV. Nécessité d'une méthode non-enzymatique de détection d'ADN	42
IV.1. Bases du SE(R)RS	43
IV.1.1. Effet Raman	43
IV.1.2. Exaltation de surface : effet SERS	44
IV.1.3. Résonance.....	46
IV.1.4. Substrats SERS.....	48
IV.2. SE(R)RS et acides nucléiques.....	51
IV.2.1. Détection d'acides nucléiques par SERS.....	51
IV.2.2. Détection d'acides nucléiques par SERRS	54
Références bibliographiques	63

CHAPITRE 2 : DETECTION D'ADN MARQUE PAR SERRS, METHODOLOGIE72

I. Matériel.....	72
I.1. Substrat SERS	72
I.2. Agent agrégateur	73
I.3. Marqueur SERRS.....	75
II. Détection d'un oligonucléotide marqué par SERRS	78
II.1. Protocole de préparation des échantillons	78
II.2. Instrumentation et paramètres de mesure Raman	79
II.3. Stabilité temporelle du signal	80
II.4. Risques de contamination	82
II.5. Limite de détection	84
Références bibliographiques	88

CHAPITRE 3 : DETECTION D'ADN SIMPLE-BRIN PAR HYBRIDATION-SERRS89

I. Introduction.....	89
II. Détection d'ADN simple-brin par la méthode Hybridation – SERRS	90
« A novel SERRS Sandwich-Hybridization Assay to detect specific DNA target » ...	92
III. Compléments expérimentaux	99
III.1. Résistance de la sonde SERRS aux hautes températures	99
III.2. Choix des séquences cibles	100
III.3. Choix des sondes de capture et de détection	101
IV. Optimisation du protocole d'hybridation.....	103
IV.1. Réduction de l'adsorption non spécifique	103
IV.1.1. Optimisation de l'étape de lavage	103
IV.1.2. Composition du milieu de lavage et ajout d'un surfactant	104
IV.1.3. Elimination de l'hybridation non-spécifique	106
Références bibliographiques	109

CHAPITRE 4 : DETECTION D'ADN DOUBLE-BRIN PAR HYBRIDATION-SERRS110

I. Introduction.....	110
II. Détection non-enzymatique d'ADN double-brin par la méthode Hybridation – SERRS	112
« Enzyme-free detection and quantification of double-stranded nucleic acids»	114
Références bibliographiques	122

CHAPITRE 5 : COMPARAISON HYBRIDATION-SERRS / PCR POUR LA DETECTION D'ADN DOUBLE-BRIN DEGRADE123

I. Introduction.....	123
II. Analyse d'ADN dégradé par la méthode Hybridation – SERRS et comparaison avec la PCR	124
« A SERRS-hybridization assay for the detection of DNA sequences refractory to PCR»	126
III. Compléments expérimentaux : la réaction de PCR	156
IV. Conclusion	156
Références bibliographiques	158

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES159

I. Conclusions	159
II. Perspectives.....	160
II.1. Amélioration de la limite de détection	160
II.1.1. Amélioration de l'efficacité de la méthode	160
II.1.2. Amélioration de la sensibilité de la méthode	162
II.2. Application au domaine biomédical	163
Références bibliographiques	165

Annexe 1 : Amplification du signal SERRS	166
---	------------

Annexe 2 : Amélioration de la spécificité de la méthode	172
--	------------

Annexe 3 : Suppléments du manuscrit « A SERRS-hybridization assay for the detection of DNA sequences refractory to PCR»	180
--	------------

PARTIE 2

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....200

I. Evidences de vie passée et chronologie de la vie	200
I.1. Traceurs utilisés	200
I.1.1. Fossiles morphologiques.....	200
I.1.2. Fossiles moléculaires	203
I.1.3. Signatures isotopiques	203
I.2. Chronologie établie	205
I.3. Hypothèses les plus fortes concernant l'origine de la Vie	205
I.3.1. Panspermie.....	205
I.3.2. Métabolisme ou réplication ?.....	206
I.3.3. Monde ARN	207
II. Contexte environnemental à l'Hadéen/Archéen : une Terre habitable ?	208
II.1. Activité géologique à l'Hadéen/Archéen.....	208
II.1.1. Présence précoce de continents	209
II.1.2. Croute primitive et tectonique des plaques.....	210

II.2. Enveloppes externes fluides.....	211
II.2.1. <i>Présence précoce d'une hydrosphère</i>	211
II.2.2. <i>Origine des volatils</i>	212
II.2.3. <i>Composition atmosphérique</i>	212
II.2.4. <i>L'océan Hadéen/Archéen : paramètres physico-chimiques</i>	214
II.2.5. <i>Hydrothermalisme</i>	216
II.3. Habitabilité ?	218
II.4. Minéralogie des fonds océaniques Hadéens/Archéens	219
III. Des molécules prébiotiques aux premiers polymères génétiques : rôle des surfaces minérales	221
III.1. Synthèse prébiotique des nucléotides	221
III.1.1. <i>Précurseurs disponibles</i>	221
III.1.2. <i>Synthèse par étape des composants du nucléotide et assemblage</i>	222
III.1.3. <i>Synthèse directe des nucléotides</i>	223
III.2. Adsorption de nucléotides par les surfaces minérales	224
III.3. Polymérisation catalysée par les surfaces minérales	229
III.4. Les phyllosilicates ferromagnésiens, produits d'altération de la croûte océanique hadéenne	233
III.4.1. <i>Structure</i>	233
III.4.2. <i>Les serpentines</i>	234
III.4.3. <i>Sites d'adsorption et mécanismes proposés</i>	236
Références bibliographiques	238

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES246

I. Matériel.....	246
I.1. Mononucléotides monophosphatés	246
I.2. Phyllosilicates étudiés	247
II. Caractérisation des surfaces minérales	251
II.1. Surfaces spécifiques	251
II.1.1. <i>Mesure par volumétrie point par point</i>	251
II.1.2. <i>Mesure du facteur de forme par volumétrie basse pression</i>	252
II.1.3. <i>Calcul des surfaces spécifiques des argiles gonflantes</i>	254
II.2. Capacité d'échange cationique (CEC)	256
II.3. Potentiel Zeta, ou potentiel électrocinétique	257
II.3.1. <i>Définition</i>	257
II.3.2. <i>Protocole</i>	258
II.3.3. <i>Résultats</i>	259
II.4. Diffraction des rayons X (DRX)	260
II.5. Spectroscopie Infrarouge en transmission	262
III. Protocole d'adsorption des acides nucléiques sur les surfaces des phyllosilicates	262
III.1. Protocole expérimental	262
III.2. Paramètres physico-chimiques testés	263
III.2.1. <i>Salinité</i>	263
III.2.2. <i>Température</i>	264
III.2.3. <i>pH</i>	264
Références bibliographiques	266

CHAPITRE 3 : ADSORPTION DE NUCLEOTIDES SUR LES PHYLLOSILICATES FERROMAGNESIENS : RESULTATS268

I. Isothermes d'adsorption	269
I.1. Adsorption différentielle des nucléotides sur une même surface.....	271
I.2. Adsorption différentielle sur les minéraux étudiés.....	271
II. Evolution de l'adsorption en fonction des paramètres environnementaux	272
II.1. Effet de la salinité.....	272
II.2. Effet du pH.....	273
II.3. Effet de la température	276
II.3.1. À pH 6,5	276
II.3.2. À pH acide	276
III. Résultats de spectroscopie Infrarouge	278
III. Résultats de diffraction des rayons X	279
Références bibliographiques	281

CHAPITRE 4 : MECANISME D'ADSORPTION DES NUCLEOTIDES SUR LES SURFACES MINERALES282

I. Introduction	282
II. Adsorption de nucléotides sur des argiles gonflantes riches en Fe, Mg, Al	284
« Adsorption of nucleotides onto Fe-Mg-Al rich swelling clays »	285
III. Comparaison avec des argiles non-gonflantes riches en Fe et Mg, et des serpentines	315
III.1. Mécanisme homologue pour tous les nucléotides ?.....	315
III.2. Quel mécanisme ?	317
III.2.1. Mécanisme d'adsorption principal à pH naturel	317
III.2.2. Explication des différences observées sur Chrys., Pyr. et NAu1	320
III.2.3. Que se passe-t-il à pH acide ?	323
Références bibliographiques	325

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES328

Références bibliographiques	331
--	------------

Liste des figures	332
--------------------------------	------------

Liste des tableaux	336
---------------------------------	------------

Abréviations utilisées dans ce manuscrit

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : ARN ribosomique

ARNm : ARN messenger

Bases azotées et nucléotides :

Base azotée	Ribonucléotide monophosphaté	Désoxyribonucléotide monophosphaté
Adénine A	AMP	dAMP
Cytosine C	CMP	dCMP
Guanosine G	GMP	dGMP
Thymine T	TMP	dTMP
Uracile U	UMP	dUMP

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphatés (utilisés en PCR)

ss : simple-brin (single-stranded)

ds : double-brin (double-stranded)

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

SERRS : Surface Enhanced Resonant Raman Spectroscopy

R6G : Rhodamine 6G

HEX : Hexachlorofluorescein

A₁₆₅₀ : aire du pic SERRS le plus intense de la R6G, centré à 1650 cm⁻¹

Pyr. : pyrophyllite

Chlor. : Chlorite

Liz. : Lizardite

Chrys. : Chrysotile

Introduction Générale

Si nous connaissons les grandes lignes du fonctionnement d'un organisme vivant, tant du point de vue métabolique que du point de vue génétique, l'origine de la Vie ubiquiste n'est pas encore élucidée. Qu'est ce qui a permis de passer d'un système chimique complexe à un système vivant ? Quand ce phénomène a-t-il eu lieu ? Où a-t-il eu lieu en surface ou en profondeur ? L'origine de la Vie est elle unique ou multiple ? Toutes ces questions concernant l'origine de la vie ont donné naissance à l'exobiologie. L'exobiologie s'intéresse à l'origine de la vie d'un point de vue interdisciplinaire impliquant chimie, physique, biologie, géologie, astrophysique et astrochimie, etc, ainsi qu'à la recherche de signaux ou de formes de vie extra-terrestre, que ce soit dans notre système solaire (Mars, Titan, Europe, Encelade, etc...) ou dans d'autres galaxies (exoplanètes...). Aux Etats-Unis on parlera plutôt d'astrobiologie.

Avant de partir à la recherche de la vie et de ses origines, il faut au préalable savoir ce que l'on recherche, et il est donc nécessaire de définir ce qu'est la vie. La définition n'est pas simple et de nombreuses tentatives sont rapportées (Luisi 1998; Ruiz-Mirazo, Pereto et al. 2004; Benner 2010; Gayon 2010). Si l'on considère la définition proposée par la NASA, est qualifié de **vivant** tout « système chimique auto-entretenu et capable d'évolution Darwinienne » (Joyce G.F. 1994). Il est également possible de partir d'une définition empirique en considérant les caractères communs à tous les êtres vivants actuels, descendants d'un dernier ancêtre commun appelé LUCA (Last Universal Common Ancestor). Tous les organismes sont organisés selon une unité de base, la cellule, très schématiquement représentée en **Figure 1**. Ces cellules, eucaryotes, bactériennes ou archées, possèdent toutes une membrane lipidique, des protéines et du matériel génétique (**Figure 1**).

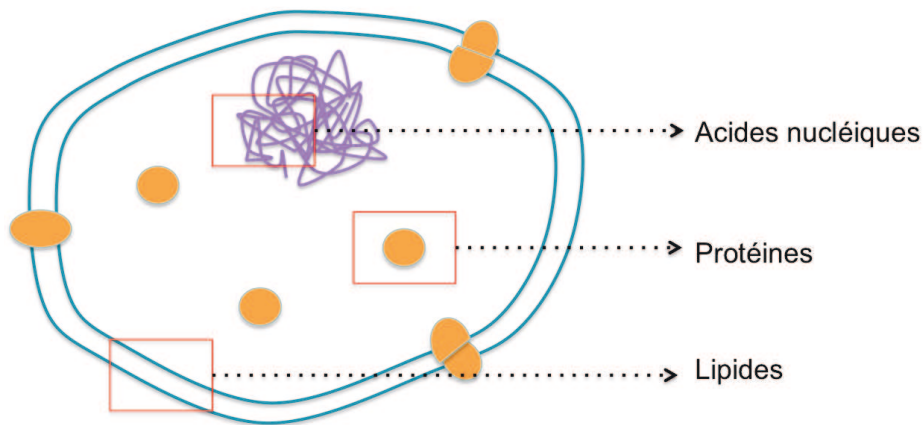


Figure 1 : La cellule, élément commun à toutes les formes de vies connues. Trois grands groupes moléculaires sont systématiquement utilisés, les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

Deux stratégies sont couramment appliquées pour étudier les origines de la Vie.

Quand l'étude est menée du présent vers le passé, on se base sur la connaissance des organismes vivants actuels pour rechercher les traces de vie passées en utilisant des méthodes de paléontologie, micropaléontologie, géochimie organique et inorganique, et biologie. La recherche de biosignatures morphologiques, moléculaires ou isotopiques permet de construire et de préciser l'arbre phylogénétique du Vivant. Notamment, les acides nucléiques permettent l'identification et la caractérisation des organismes vivants et sont au centre des recherches en biologie moléculaire, sciences de l'évolution, écologie...

La seconde stratégie adopte la direction temporelle inverse, et part du passé pour expliquer le présent. On reconstitue un système chimique prébiotique dans les conditions de l'Hadéen et/ou Archéen en utilisant les données géochimiques, géophysiques et chimiques. Ainsi, il est possible de mieux comprendre la formation des biopolymères, ainsi que des premières protocellules.

Au cours mon travail de thèse, je me suis intéressée aux acides nucléiques, polymère support de l'information génétique, selon les deux approches décrites ci-dessus, qui constituent 2 parties relativement indépendantes dans ce manuscrit.

La **première partie** s'intéresse au développement de nouvelles méthodes pour la **détection d'ADN ancien**, ou paléogénétique. A partir de la mort d'un organisme, l'ADN subit une série de dégradations et de modifications chimiques le rendant souvent difficile à analyser par les techniques classiques enzymatiques utilisées en biologie moléculaire. **L'objectif** était donc de développer une méthode totalement non-enzymatique pour la détection d'acides nucléiques qui permettrait de s'affranchir des limitations liées à la dégradation de l'ADN. Ainsi, la gamme d'échantillons accessible à l'analyse pourrait être considérablement élargie et il serait ainsi possible de repousser l'âge des plus anciennes séquences d'acides nucléiques retrouvées.

Le chapitre 1 introduira la notion de biosignature en général, et présentera l'état de l'art dans le domaine de la paléogénétique. Nous nous intéresserons notamment aux méthodes d'analyse couramment utilisées et à leurs limites. Nous verrons enfin comment la spectroscopie SERRS (Surface Enhanced Resonant Raman Scattering) peut être une alternative prometteuse aux méthodes de détection enzymatique. Dans un second chapitre, je présenterai la méthodologie de préparation d'un échantillon d'ADN et de mesure SERRS. Les différents chapitres suivants montrent comment on approche progressivement de l'analyse d'ADN naturel double-brin, potentiellement dégradé. La mise au point d'une méthode de détection spécifique d'ADN simple brin basée sur l'hybridation moléculaire couplée à une détection par SERRS est détaillée dans le troisième chapitre. Comme l'ADN est principalement sous forme double-brin dans la nature, nous avons développé une méthode de détection spécifique d'ADN double brin présentée dans le chapitre 4. Nous exploitons également les propriétés de la spectroscopie SERRS pour détecter simultanément plusieurs séquences d'ADN dans un

mélange et donc potentiellement plusieurs espèces. Dans le 5^e chapitre, nous avons analysé de l'ADN dégradé à la fois par une réaction de PCR classique et par la méthode de détection SERRS décrite précédemment. Ainsi, nous sommes parvenus à détecter des molécules d'ADN double-brin dégradées jusqu'alors inaccessibles par les méthodes traditionnelles de PCR. Enfin, dans le sixième chapitre, les conclusions et perspectives offertes par ce travail sont discutées.

Dans la **seconde partie** de ce manuscrit, je me suis intéressée à **l'origine du matériel génétique**. Trois étapes clés sont considérées comme nécessaires à la formation des molécules d'acides nucléiques:

- la synthèse des nucléotides à partir de molécules prébiotiques
- la concentration de ces briques élémentaires
- la polymérisation en polymères plus ou moins longs

Nous nous intéressons à la deuxième étape, en évaluant l'hypothèse d'une concentration des nucléotides par **adsorption** sur des surfaces minérales plausibles dans l'environnement de Hadéen et/ou Archéen. Ce travail a pour **objectifs**:

1) d'étudier l'adsorption de nucléotides sur une série de minéraux potentiellement présents dans le contexte géologique de l'origine de la Vie. En effet, les travaux précédents se sont concentrés sur des surfaces modèles comme le rutile (Cleaves, Jonsson et al. 2010), ou surtout la montmorillonite (Banin, Lawless et al. 1985; Ferris, Ertem et al. 1989).

2) de préciser les mécanismes d'adsorption des nucléotides sur ces minéraux en choisissant des minéraux de structure et de propriétés de surface variées parmi les phyllosilicates ferromagnésiens

3) de proposer des conditions environnementales dans lesquelles l'adsorption des nucléotides sur les surfaces minérales est optimale.

Le premier chapitre synthétise les connaissances concernant l'origine de la Vie d'un point de vue temporel, environnemental, et minéralogique, afin de préciser le contexte de l'origine du matériel génétique. Le rôle des surfaces minérales dans l'origine de la Vie sera discuté, tout particulièrement en tant que surfaces « concentratrices ». Dans un 2nd chapitre, nous présentons les conditions expérimentales de notre étude. Les nucléotides et minéraux choisis y sont décrits, et les méthodes de caractérisation des minéraux ainsi que les protocoles expérimentaux sont détaillés. Un troisième chapitre regroupe les données obtenues. L'interprétation des données en terme de mécanisme d'adsorption des nucléotides à la surface des phyllosilicates ferro-magnésiens fait l'objet du 4^{ème} chapitre. Enfin, le cinquième chapitre conclue sur les conditions environnementales optimales pour une adsorption maximale des nucléotides sur les surfaces minérales, et propose quelques pistes pour approfondir ce travail.

Références bibliographiques

- Banin, A., J. G. Lawless, et al. (1985). "pH profile of the adsorption of nucleotides onto montmorillonite. II. Adsorption and desorption of 5'-AMP in iron-calcium montmorillonite systems." Orig Life Evol Biosph **15**: 89-101.
- Benner, S. A. (2010). "Defining life." Astrobiology **10**(10): 1021-1030.
- Cleaves, H. J., 2nd, C. M. Jonsson, et al. (2010). "Adsorption of nucleic acid components on rutile (TiO₂) surfaces." Astrobiology **10**(3): 311-323.
- Ferris, J. P., G. Ertem, et al. (1989). "The adsorption of nucleotides and polynucleotides on montmorillonite clay." Orig Life Evol Biosph **19**(2): 153-164.
- Gayon, J. (2010). "Defining life: synthesis and conclusions." Orig Life Evol Biosph **40**(2): 231-244.
- Joyce G.F., Deamer D. W., Fleischaker G. (1994). Foreword. Origins of life : the central concepts, Jones and Bartlett.
- Luisi, P. L. (1998). "About various definitions of life." Orig Life Evol Biosph **28**(4-6): 613-622.
- Ruiz-Mirazo, K., J. Pereto, et al. (2004). "A universal definition of life: autonomy and open-ended evolution." Orig Life Evol Biosph **34**(3): 323-346.

PARTIE 1

Chapitre 1

Introduction

I. Notion d'archéologie moléculaire

I.1 Fossiles moléculaires

Après la mort d'un organisme, deux types de fossiles peuvent être retrouvés et ainsi témoigner de sa présence passée. On trouvera des **fossiles morphologiques** : os, dents, ou plus rarement des tissus mous, exosquelettes, microfossiles... Des moulages ou empreintes des organismes pourront également persister. Les molécules organiques résultant de la dégradation cellulaire *post mortem* sont également conservées dans certaines conditions ; l'étude de ces **fossiles moléculaires** constitue l'archéologie moléculaire (**Figure I-1**).

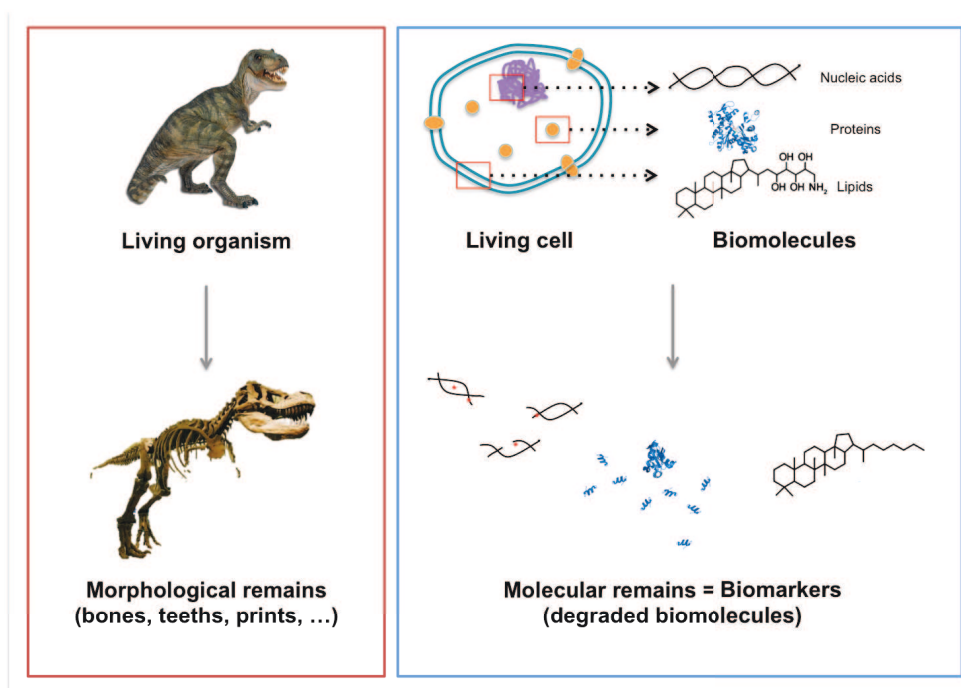


Figure I-1 : Fossiles morphologiques vs fossiles moléculaires

Ces restes moléculaires présentent un fort intérêt scientifique dans des domaines variés de l'écologie en passant par la biologie moléculaire et l'évolution. En effet, les 4 domaines moléculaires, polysaccharides, lipides, protéines et acides nucléiques, sont parfois préservés

dans les sédiments voire même dans les roches sédimentaires et indiquent alors une biogénicité et une provenance biologique spécifique. On les appelle « **biomarqueurs** » ou « **biosignatures** ». Ces polymères organiques ne restent cependant pas intacts lors de la fossilisation, ils subissent des dégradations au cours du temps selon le degré de la diagénèse et les paramètres environnementaux (Température, Pression, radiations UV, etc.). L'information contenue dans ces polymères n'est donc pas toujours conservée à long terme. D'autre part, les 4 domaines biomoléculaires précédemment cités ne recèlent pas la même quantité d'information biologique. Nous traiterons les différents types de molécules par ordre croissant d'information contenue, des polysaccharides aux acides nucléiques.

I.2 Les polysaccharides

Les *polysaccharides* sont des polymères de sucres. Les monomères et les oligomères sont très solubles et donc facilement dégradés. Les longs polysaccharides servant de polymères structuraux aux organismes sont plus aisément préservés. Par exemple la chitine, de formule $(C_8H_{13}NO_5)_n$ est un constituant majeur des exosquelettes d'insectes et d'arthropodes. La plus ancienne trace de chitine a été identifiée dans des échantillons lacustres Oligocène de 25 Ma par pyrolyse associée à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) (Stankiewicz, Briggs et al. 1997). Plus récemment, Gupta et al. (2007) ont analysé par la même méthode des échantillons végétaux d'angiospermes et de conifères provenant du même dépôt, et ont identifié la présence de polysaccharides. De même, Boyce et al. (2002) font état de la détection par spectroscopie XANES de polysaccharides associés à de la lignine dans les parois cellulaires de tissus végétaux fossiles vieux de 40 Ma à 400 Ma.

Les polysaccharides contenant peu d'information, leur présence ne permet pas d'identifier un organisme, même si elle constitue une signature biologique.

I.3 Les lipides

Le groupe moléculaire des lipides regroupe les cires, les graisses, les pigments, les hormones, et bien sûr les lipides membranaires ou phospholipides. Ces molécules ont un très fort potentiel de préservation et sont donc particulièrement bien conservées dans le registre fossile. De plus, les dégradations subies par les lipides au cours du temps et de la diagénèse commencent à être bien comprises (Hebting, Schaeffer et al. 2006; Eigenbrode 2008; Werne, Lyons et al. 2008). Cela facilite l'interprétation des fossiles moléculaires.

Les lipides présentent une très grande diversité et sont spécifiques de groupes d'organismes. Il existe notamment des biosignatures lipidiques des 3 domaines de la Vie (Archées, Bactéries, Eucaryotes). Ainsi, les Archées sont les seuls organismes à produire des lipides membranaires GDGT (Tétraéthers de glycérol) (Schouten, Hopmans et al. 2000; Kuypers, Blokker et al. 2001). Kuypers et al. (2001) ont détecté une grande abondance de GDGT dans des marnes noires du Crétacé (112 Ma), et les abondances relatives des différents GDGTs ont révélé une expansion marine massive des Crenarchaeota, un genre d'Archées. Les stérols, triterpénoïdes tétracycliques dérivés du cholestérol, sont caractéristiques des Eucaryotes et les triterpénoïdes pentacycliques bactériohopanepolyols sont caractéristiques des Bactéries (Eigenbrode 2008). Ainsi l'analyse du contenu lipidique d'échantillons fossiles permet de reconstituer partiellement au moins la biodiversité. Les lipides apportent également des précisions sur le métabolisme des organismes. Par exemple, au sein du groupe des hopanes, on distingue le 2- α -methylhopane caractéristique des cyanobactéries (Brocks, Buick et al. 2003; Brocks, Love et al. 2005) et le 3- β -methylhopane caractéristique de bactéries méthanotrophes (Summons, Jahnke et al. 1994; Brocks, Buick et al. 2003; Brocks, Love et al. 2005). Le **Tableau I-1** fournit quelques exemples de biomarqueurs lipidiques spécifiques, ainsi que leur provenance biologique.

Tableau I-1 : Exemples de biomarqueurs lipidiques, ainsi que leur provenance (simplifié d'après Brocks et al., 2003 , 2009 ; pour une vue plus complète, voir (Brocks and Banfield 2009).

	Biomarqueur lipidique	Provenance
Archées	Archeol Ethers de glycerol GDGT	Archées
	Crenarchaeol	Crenarchaeota
Bactéries	Hopanes	Bactéries (Cyanobactéries incluses)
	2 α -Methylhopanes	Cyanobactéries à photosynthèse oxygénique
	3 β -Methylhopanes	Bactérie hétérotrophe, probablement Méthanotrophe et/ou Methylophiles
Eucaryotes	Steroides	Eucaryotes
	Oleanane	Angiospermes
	Phyllocladanes	Conifères
	Alkénones	Algues marines

Une analyse des rapports isotopiques du Carbone peut apporter des précisions quant à la biogénicité des molécules. La vie sélectionne préférentiellement le carbone léger ^{12}C , donnant lieu à des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ négatifs, qui varient d'un groupe d'organismes à un autre. Les plantes supérieures présentent par exemple des $\delta^{13}\text{C}$ de -28‰, tandis que les Archées ont des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ moins négatives entre -17 et -20‰ (Kuypers, Blokker et al. 2001).

Au cours des années 2000, l'âge des plus anciens biolipides analysés était sujet à controverse. Brocks et al. (Brocks, Logan et al. 1999; Brocks, Buick et al. 2003) ont extrait des lipides dans des échantillons de marnes noires Archéennes provenant d'Australie (craton de Pilbara) datées de 2.7 Ga. La présence de 2- α -methylhopane et de stéranes fut interprétée comme une preuve de la présence de cyanobactéries et d'eucaryotes à l'Archéen. Cependant, Rasmussen et al. (2008) apportent de solides arguments géochimiques contre l'endogénicité des lipides analysés par Brocks qui proviendraient plutôt d'une contamination par des hydrocarbures plus jeunes (Fischer 2008; Rasmussen, Fletcher et al. 2008). Brocks et al. (2011) confirment l'hypothèse d'une contamination. Les plus anciens biomarqueurs lipidiques analysés à ce jour

ne sont donc pas Archéens. La plus ancienne analyse de biomarqueurs lipidiques univoque daterait plutôt de 1,6 Ga (Brocks, Love et al. 2005): des caroténoïdes permirent d'identifier des bactéries sulfo-oxydantes pourpres *Chromatiaceae* et vertes *Chlorobiaceae* dans les roches de la Formation de Barney Creek (nord de l'Australie) datée de 1,64 Ga.

L'étude des biomarqueurs lipidiques a aussi permis la mise au point de proxys de température. Le nombre de cycles incorporés dans les GDGT est en effet corrélé linéairement avec la température des eaux océaniques de surface (Schouten, Hopmans et al. 2002). De même, les alkénones produits par des algues marines permettent d'estimer la température par le nombre de leurs liaisons doubles (Brassell, Brereton et al. 1986).

Les lipides sont donc des biomarqueurs à très fort potentiel de préservation. Ils permettent d'identifier des groupes d'organismes, sans toutefois renseigner sur l'espèce.

I.4 Les protéines et acides aminés

Les protéines sont des polymères d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Elles sont issues de la traduction et transcription de l'ADN, contiennent donc une grande quantité d'information et peuvent être spécifique à une espèce. Il existe des bases de données regroupant les séquences des protéines connues (*e.g.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

Les protéines d'échantillons anciens ou fossiles peuvent être analysées par chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Solazzo et al. (2008) ont ainsi pu identifier la myoglobine du phoque commun *Phoca vitulina*, dans des tessons en argile provenant d'Alaska et datés entre le 13 et le 15^e siècle, permettant d'identifier les sources alimentaires de l'époque. Les mêmes techniques sont également appliquées à l'étude des cosmétiques et médicaments anciens, afin d'obtenir des informations sur les matériaux et techniques utilisés (Ribechini, Modugno et al. 2011). La protéomique est également beaucoup utilisée en archéométrie pour analyser les protéines présentes sur des peintures afin d'identifier les matériaux sources (Palmieri, Vagnini et al. 2011). Dallongeville et al. (2011)

ont également prouvé que l'on pouvait identifier l'espèce animale utilisée dans la réalisation de la colle de certaines œuvres d'art.

Les acides aminés sont des molécules chirales et présentent différents énantiomères, de type D ou L. Les organismes vivants n'utilisent que l'énantiomère de type L. Cette propriété d'homochiralité des acides aminés et protéines est une signature couramment utilisée pour attester de la biogénicité d'un échantillon. La stratégie de recherche de vie sur Mars repose entre autres sur ce principe (Kminek and Bada 2006). Après la mort de l'organisme, le mélange chiral d'acides aminés qu'il contient commence un processus de racémisation qui dure en moyenne entre 1 et 10 Ma (Bada, Wang et al. 1999). Le degré de racémisation d'un échantillon, ou son rapport D/L, est parfois utilisé comme méthode de datation de l'échantillon (Bada, Ehrenfreund et al. 2008; Summons, Albrecht et al. 2008). Le degré de racémisation renseigne sur la préservation des séquences d'ADN potentiellement présentes dans l'échantillon (Poinar, Hoss et al. 1996). En effet aucune séquence nucléique ancienne n'a pu être extraite d'échantillons dont le rapport D/L de l'acide aspartique excédait 0.08 (Poinar, Hoss et al. 1996).

I.5 Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides, dont la structure est présentée en **Figure I-2**. Deux types d'acides nucléiques sont utilisés par les organismes vivants. L'ADN, ou acide désoxyribonucléique, est la molécule support de l'information génétique au complet. L'ARN, acide ribonucléique, est impliqué dans la formation des protéines par le processus de transcription (ARN messenger, ARN ribosomique).

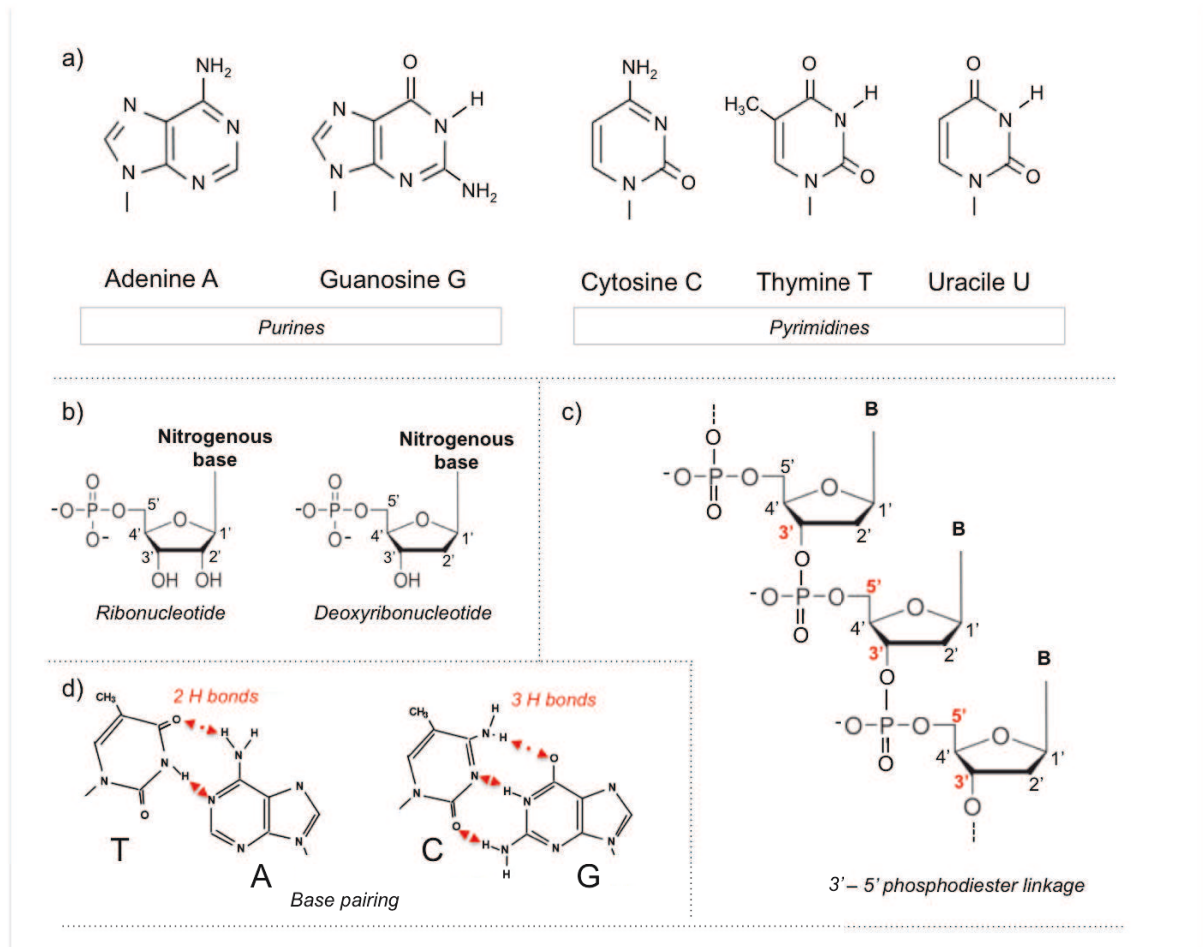


Figure I-2 : a) Structures 2D des bases puriques et pyrimidiques ; b) Structure 2D d'un ribonucléotide et d'un désoxyribonucléotide ; c) Chaîne de désoxyribonucléotides liés au niveau des carbones 3' et 5' par des liaisons phosphodiester ; d) Appariement des bases azotées trouvé dans l'ADN. Dans l'ARN, T est remplacé par U.

Dans les deux cas, un nucléotide est composé d'une base azotée, d'un sucre, et de groupes phosphate. Seul le sucre diffère : pour l'ARN il s'agit de ribose, pour l'ADN de 2'-désoxyribose (**Figure I-2 b**). Les nucléotides sont liés par des liaisons phosphodiester entre le carbone 3' du sucre du premier nucléotide et le carbone 5' du second (**Figure I-2 c**). Il existe 5 bases azotées, divisées en 2 groupes (**Figure I-2 a**). L'adénine A et la guanosine G appartiennent aux bases puriques et sont composées de 2 cycles. La cytosine C, la thymine T et l'uracile U sont des bases pyrimidiques et ne sont formées que d'un cycle. A s'apparie avec T via 2 liaisons H. C s'apparie avec G via 3 liaisons H, ce qui rend les associations C-G plus fortes (**Figure I-2 d**). Les molécules d'ADN contiennent uniquement A, C, G et T. Dans

l'ARN, T est remplacée par U. Une courte séquence d'acides nucléiques est appelée oligonucléotide.

L'ARN est la plupart du temps sous forme simple-brin. Au contraire, l'ADN se trouve majoritaire en forme double-brin ; les 2 brins sont appariés et structurés en double hélice.

Après la mort d'un organisme, son ADN/ARN accumule des dégradations plus ou moins rapidement selon les conditions environnementales. Des calculs théoriques prévoient que les molécules d'ADN peuvent être préservées jusqu'à 10000 ans en région tempérée, et 100 ka au maximum à des températures plus froides (Poinar, Hoss et al. 1996; Smith C.I. 2001; Willerslev and Cooper 2005). Cependant, des molécules d'ADN détectées datant de 300 à 900 ka ont pu être détectées (Willerslev, Hansen et al. 2003; Willerslev, Hansen et al. 2004; Willerslev, Cappellini et al. 2007). Ces molécules proviennent d'échantillons conservés dans des milieux très froids comme la Sibérie (Willerslev, Hansen et al. 2003) ou des carottes de glace (Willerslev, Cappellini et al. 2007). L'obtention de séquences d'ADN anciennes dépend donc fortement des conditions de préservation (Hofreiter, Paabo et al. 2001; Anchordoquy and Molina 2007; Molak and Ho 2011), et n'est pas directement corrélée à l'âge de l'échantillon (Hoss, Jaruga et al. 1996; Poinar, Hoss et al. 1996; Poinar and Stankiewicz 1999). C'est l'âge dit thermique de la molécule qui importe, comme l'a montré Smith en 2001, et comme les molécules les plus vieilles semblent démontrer. L'âge thermique est calculé en prenant en compte le taux de dépurination. Lindahl et al. (1972) rapportent un taux de dépurination de $4 \times 10^{-9} \text{ sec}^{-1}$ à pH 7,4 et 70° C. Un échantillon conservé dans un milieu froid aura plus de chances de contenir de l'ADN analysable par les techniques usuelles de biologie moléculaire. Hansen et al. (2006) calculent un âge de survie de 400 ka pour des séquences d'ADN ribosomique 16S bactérien de 120 bp.

De même, un échantillon ayant subi une dessiccation rapide ou de fortes concentrations en sels aura de plus fortes chances de contenir de l'ADN amplifiable, indépendamment de son

âge (Lindahl 1993).

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée aux acides nucléiques. Ils permettent non seulement la détermination univoque de la présence d'un genre ou d'une espèce, ou même d'un individu, mais apportent également des précisions sur sa position dans l'arbre phylogénétique du vivant, son métabolisme, etc... Cela fait des acides nucléiques des biosignatures extrêmement précieuses et complètes. Les nombreux progrès technologiques réalisés au cours des dernières années, réduisant le temps et le coût de l'analyse des acides nucléiques, en font LA priorité dans le domaine de la recherche en biomarqueurs. L'étude des acides nucléiques anciens a donné lieu à une nouvelle discipline, la paléogénétique.

II. Paléogénétique et analyse d'ADN ancien et/ou dégradé

Un documentaire intitulé « Archéologues de l'ADN » peut être visionné à l'adresse <http://capcanal.com/video.php?rubrique=5&emission=4&key=cJdUoK5fzq>.

II.1 Caractéristiques / Taphonomie de l'ADN ancien

L'ADN ancien accumule les dégradations à partir de la mort de l'organisme. Certaines modifications apparaissent spontanément, comme les désaminations et les déméthylations. La plupart des modifications dépendent des conditions physico-chimiques : température, conditions oxydantes ou non, hydrolyse, niveau des radiations UV, etc... et donc de l'environnement de préservation (Hofreiter, Paabo et al. 2001). Les dégradations *post mortem* subies par l'ADN ont été décrites dans de nombreuses études (Paabo 1989; Lindahl 1993; Hoss, Jaruga et al. 1996; Mitchell, Willerslev et al. 2005; Willerslev and Cooper 2005) et sont représentées dans la **Figure I-3**.

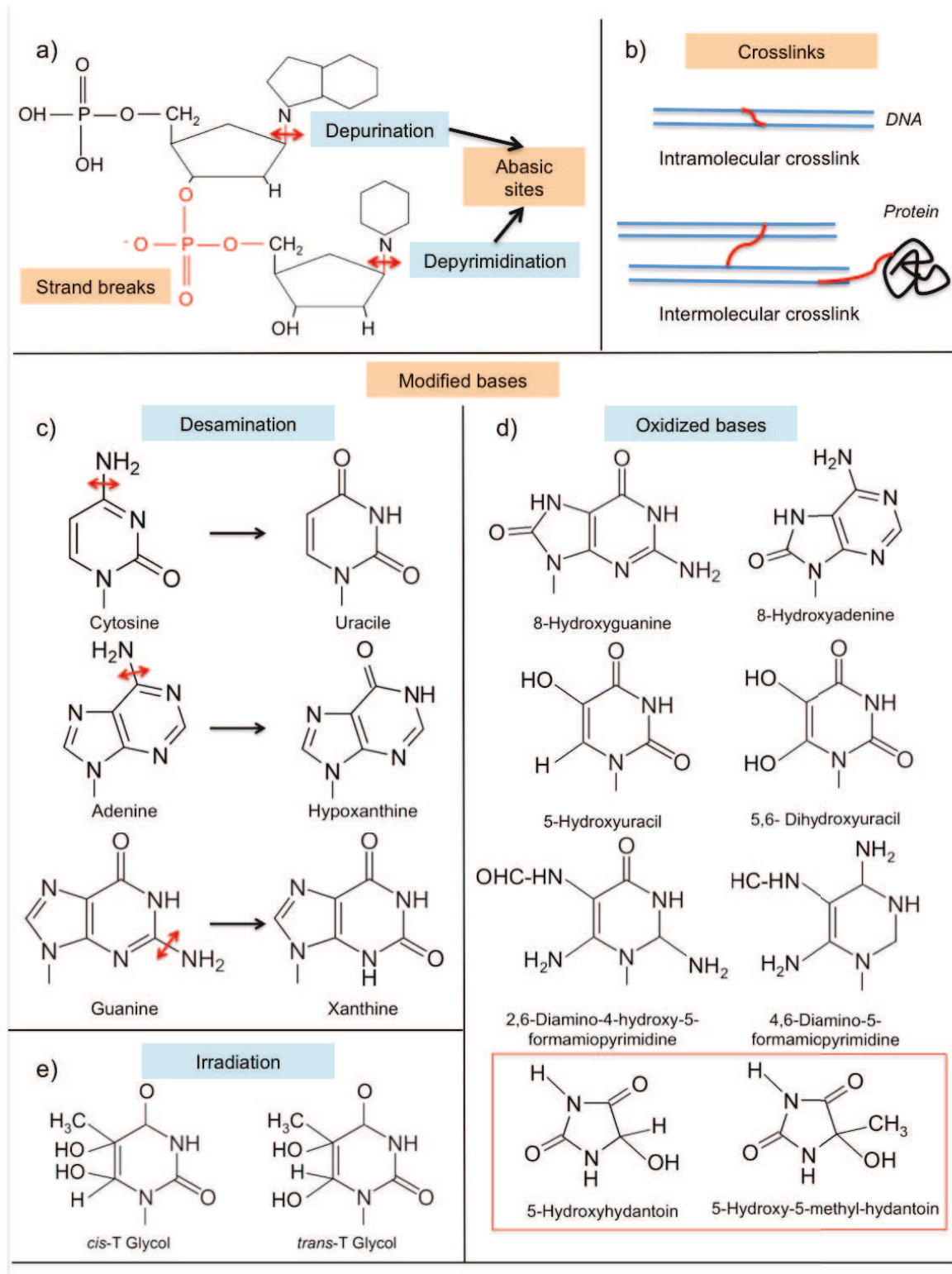


Figure I-3 : Dégénération fréquente de l'ADN ancien. a) Fragmentation et perte de bases ; b) Crosslinks ; c, d et e) bases modifiées par désaminations, oxydation et irradiation. La présence de sites abasiques, crosslinks et hydantoïnes (bases entourées d'un rectangle rouge) stoppe l'action d'élargissement des ADN-polymérase.

Les acides nucléiques subissent en premier lieu une **fragmentation** intense, due à l'action de nucléases endogènes libérées lors de l'autolyse cellulaire et responsables du clivage des liaisons phosphodiester (**Figure I-3 a**). Il est extrêmement rare de retrouver des molécules d'ADN ancien excédant 1.5 kb. Pour comparaison, le génome humain diploïde contient environ 6 Gbp et celui d'une bactérie environ 1 Mbp. La taille moyenne des fragments d'ADN ancien est comprise entre 100 et 200 paires de bases (Paabo 1989). La fragmentation de l'ADN au niveau des liaisons phosphodiester est accentuée par les réactions d'**hydrolyse** favorisées en milieu humide. L'hydrolyse des liaisons N-glycosidiques reliant les bases azotées au sucre dans la molécule d'acide nucléique crée des sites dits « abasiques » (**Figure I-3 a**). Les purines sont plus sensibles à l'hydrolyse, c'est ce qu'on appelle la dépurination (Lindahl 1993). La présence de sites abasiques fragilise la molécule d'ADN, augmentant d'avantage la fragmentation (Austin, Smith et al. 1997). Les ruptures de brins à l'emplacement de sites abasiques s'effectuent à un taux similaire aux pertes de bases (Paabo, Poinar et al. 2004).

En **conditions oxydantes**, les bases azotées subissent diverses modifications chimiques (Hoss, Jaruga et al. 1996) menant à la formation de formamidopyrimidines et d'hydantoïnes (**Figure I-3 d**). L'étude de Pääbo (1989) a permis d'établir que les bases pyrimidiques sont plus dégradées que les bases puriques. En effet, les profils chromatographiques d'un ADN moderne et d'un ADN ancien montrent un large déficit de pyrimidines dans l'ADN ancien, tandis que les quantités de purines sont équivalentes.

Les **radiations** de haute énergie entraînent également des lésions dans l'ADN (**Figure I-3 e**). Les radiations UV sont responsables de la formation de dimères pyrimidiques lorsque 2 pyrimidines sont consécutives. Ces modifications photochimiques, réparées *in vivo* par l'action d'enzymes appelées photolyases, sont fréquentes dans l'ADN ancien (Orlando 2000). Les radiations de plus haute énergie (rayons X, rayons gamma) induisent l'ouverture des

cycles et la formation de bases modifiées (Orlando 2000).

L'ADN ancien est également parsemé de **crosslinks moléculaires** (**Figure I-3 b**). Il s'agit de liens qui entravent l'ouverture des 2 brins de l'ADN, soit de manière intramoléculaire entre les 2 brins de la molécule d'ADN, ou intermoléculaires entre un brin d'ADN et une autre molécule, protéine, sucres dérivés de la réaction de Maillard, acides gras (Poinar, Hofreiter et al. 1998; Paabo, Poinar et al. 2004). L'étude de séquences d'ADN ancien provenant du permafrost Sibérien, âgées de 10 ka à 400 ka, par Hansen et al. (2006) a permis de prouver que les crosslinks s'accumulent 100 fois plus rapidement que les ruptures de brins.

II.2 Début de la paléogénétique

Les scientifiques ont commencé à s'intéresser à l'ADN ancien dans les années 80. En 1984, Higuchi et al. (1984) extraient avec succès d'une séquence d'ADN ancien d'un spécimen de *Quagga*, une espèce disparue de la famille des Equidés. Cette séquence est obtenue par les techniques naissantes de clonage bactérien. Pääbo et al. (1985) obtiennent une séquence d'ADN d'une momie égyptienne par les mêmes méthodes. Ces études parfaitement indépendantes permirent d'établir que l'ADN peut « persister » plusieurs siècles. Cette découverte ouvrit de nombreuses voies de recherche, particulièrement dans les domaines de l'évolution. Cependant, les conditions de préservation des deux spécimens analysés par Higuchi et al. et Pääbo et al. sont particulièrement exceptionnelles, l'un étant taxidermisé et l'autre momifié. Il est rare de retrouver des tissus mous en aussi bon état de conservation et il faudra attendre quelques années et une nouvelle méthode pour pouvoir étendre cette notion d'ADN conservé à une plus large gamme d'échantillons, tels que les os, les dents et les fèces fossiles.

II.3 Émergence de la PCR et essor de la paléogénétique

Saiki et al. (1985) développent le diagnostic de la drépanocytose en amplifiant enzymatiquement des séquences spécifiques d'ADN génomique de la beta-globine. Ils observent une hausse exponentielle du nombre de copies du fragment ciblé (220000 copies). Cette réaction sera décrite en 1986 par Mullis et al. sous le nom de Polymerase Chain Reaction (PCR) (Mullis, Faloona et al. 1986). Reposant alors sur l'action de l'ADN-polymérase *E. coli* polymérase I, la PCR permet de cibler un fragment spécifique d'un génôme et de l'amplifier afin de pouvoir l'étudier en détail. Cela permet de travailler à partir d'infimes quantités d'ADN, ce qui est particulièrement adapté à l'étude d'ADN ancien justement, dont la quantité est relativement faible. Cependant, la nécessité de dénaturer l'ADN cible et donc de chauffer la solution à plus de 90°C entraînait un arrêt du fonctionnement de la polymérase I de *E. coli*. qu'il était donc nécessaire de rajouter après chaque étape de dénaturation. En 1989, une enzyme appelée *Taq polymerase* fut isolée d'une bactérie thermophile vivant dans des sources hydrothermales, *Thermus aquaticus*. Cette enzyme résiste très bien aux fortes températures, et par conséquent aussi à l'étape de dénaturation nécessaire à l'amplification enzymatique. Son introduction dans la PCR fut une révolution dans le domaine de la biologie moléculaire. Une amplification exponentielle pouvait être obtenue simplement à partir d'un mélange initial d'ADN cible, d'amorces, de *Taq polymérase* et de nucléotides. Kary Mullis reçut pour cette découverte le prix Nobel de chimie en 1993.

La PCR est une réaction cyclique, résumée par la **Figure I-4**.

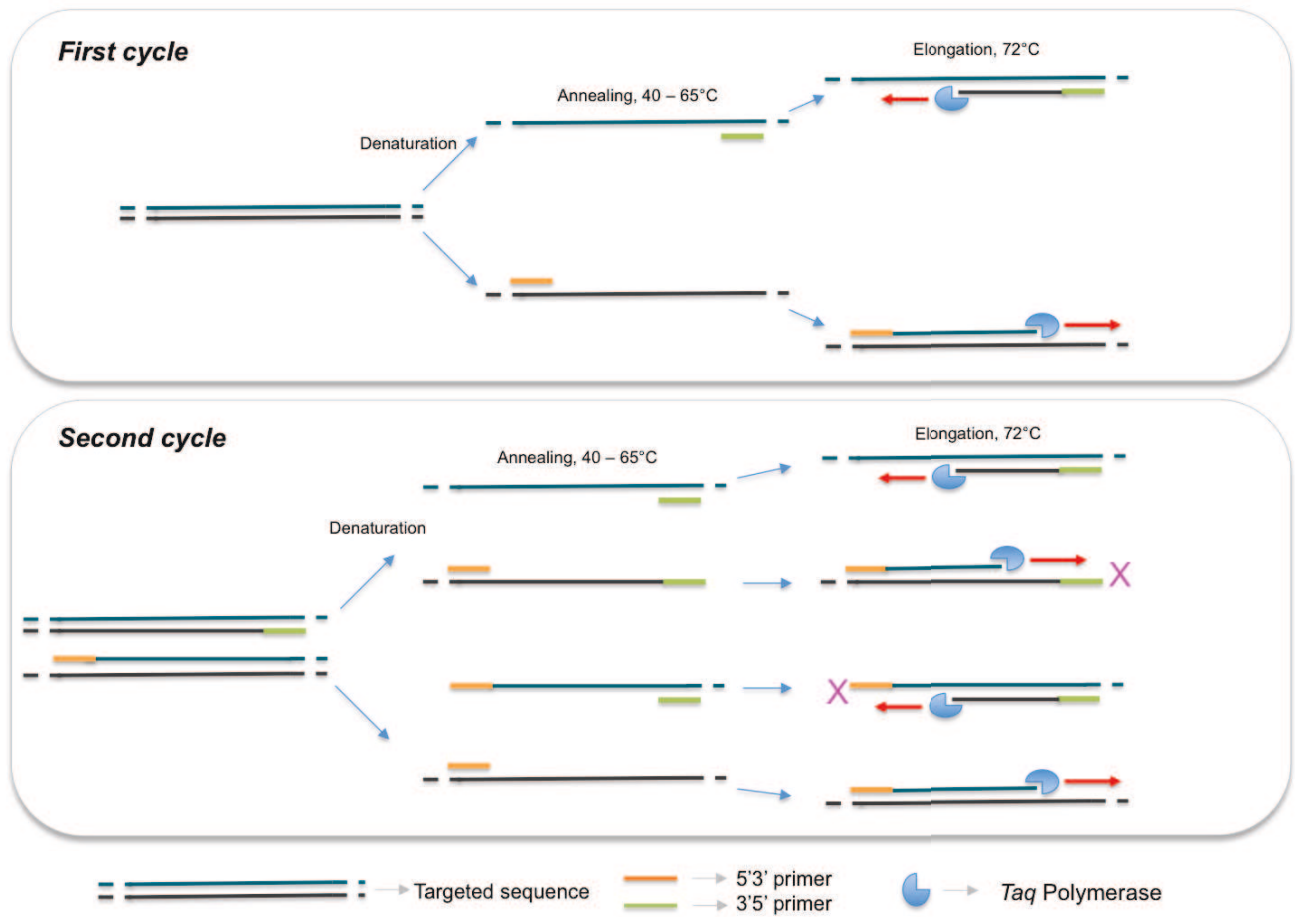


Figure I – 4 : Principe de la PCR. Les 2 premiers cycles sont décrits en détails. À partir du deuxième cycle, le fragment ciblé est amplifié à la taille voulue. En théorie, n cycles donneront 2^n copies du fragment cible.

Au préalable, on élabore des amorces (ou primers) qui sont des oligonucléotides spécifiques, qui serviront de point d'initiation à l'élongation des répliques par la *Taq polymérase*. On mélange dans un tube un échantillon contenant l'ADN cible, les amorces spécifiques, la *Taq polymérase* ainsi que des nucléotides tri-phosphatés. La première étape d'un cycle de PCR est la dénaturation de l'ADN cible par chauffage à plus de 90°C. Ensuite on abaisse la température vers de 50°C pour permettre l'hybridation des amorces à l'ADN cible. La température est ensuite remontée à 72°C, qui est la température optimale de fonctionnement de l'enzyme *Taq polymérase*. L'enzyme ajoute des nucléotides à la suite de l'amorce en « lisant » le brin d'ADN cible. Le brin complémentaire est ainsi reconstitué de proche en

proche. Pour 1 molécule d'ADN cible au temps initial, on aura en théorie 2^n copies du segment ciblé au bout de n cycles de PCR.

La réaction de PCR a tout de suite été largement utilisée dans tous les domaines de la biologie moléculaire : écologie (Smith and Osborn 2009), virologie (Belak and Ballagi-Pordany 1993), sciences de l'évolution (Cavalli-Sforza and Feldman 2003).

De nombreuses problématiques peuvent être abordées grâce à la paléogénétique. Willerslev et al. (2007) ont par exemple reconstruit le paléoenvironnement et paléoecosystème du Groenland il y a 400-900 ka en identifiant les espèces de végétaux et d'insectes présents dans des carottes glaciaires. Au delà de l'identification taxonomique, l'étude des séquences d'acides nucléiques anciennes permet également d'obtenir des informations sur l'évolution des espèces (Orlando, Darlu et al. 2006), sur les migrations préhistoriques (Lalueza-Fox, Sampietro et al. 2004), sur la domestication animale par l'homme (Fernandez, Hughes et al. 2006), sur l'émergence de pathologies telles que le « simian T-cell leukemia virus » de Type 1 (Calvignac, Terme et al. 2008) ou la tuberculose (Donoghue, Spigelman et al. 2004).

II.4 Séquençage haut débit

Récemment, l'avènement des méthodes de séquençage à haut débit a apporté une nouvelle révolution en biologie moléculaire, et particulièrement dans le domaine de la paléogénétique. Le séquençage rapide permet un diagnostic rapide, et le haut-débit a permis de réaliser des études à l'échelle des génomes modernes et anciens. On peut donc maintenant parler non seulement de paléogénétique mais aussi de paléogénomique.

On distingue plusieurs types de séquençage haut débit dits de nouvelle-génération, comparés dans le **Tableau I-2** et présentés ci après.

Tableau I-2 : Comparaison des différentes méthodes de séquençage haut-débit (d'après Gupta et al., 2008).

	454-FLX	Solexa/Illumina	SOLiD	Helicos tSMS	PacBio SMRT
Longueur de molécules (bp)	240-400	35	35	30	100 000
Durée d'un run (h/Gb)	75	56	42	12	<1
Facilité d'utilisation	-	-	-	+	+
Coût (pour 1 génome humain)	1 000 000 \$	60 000 \$	60 000 \$	70 000 \$	Faible coût

II.4.1 Séquençage de deuxième génération

Trois systèmes sont couramment utilisés, le système 454 de Roche FLX, Illumina Solexa et le système SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) d'Applied Systems. Tous nécessitent une étape préliminaire d'amplification du matériel par PCR, soit en émulsion sur billes magnétiques pour les systèmes 454 et SOLiD, soit en pont pour la technologie Illumina (Mardis 2008; Pettersson, Lundeberg et al. 2009). Le séquençage se fait ensuite au cours de la copie des molécules :

- soit par pyroséquençage (système 454)
- soit par incorporation de nucléotides marqués par des molécules fluorescentes par une ADN polymérase (système Illumina)
- soit par ligation de sondes spécifiques marquées par des molécules fluorescentes (système SOLiD)

Les 3 méthodes sont décrites en détail dans la **Figure I – 5**.

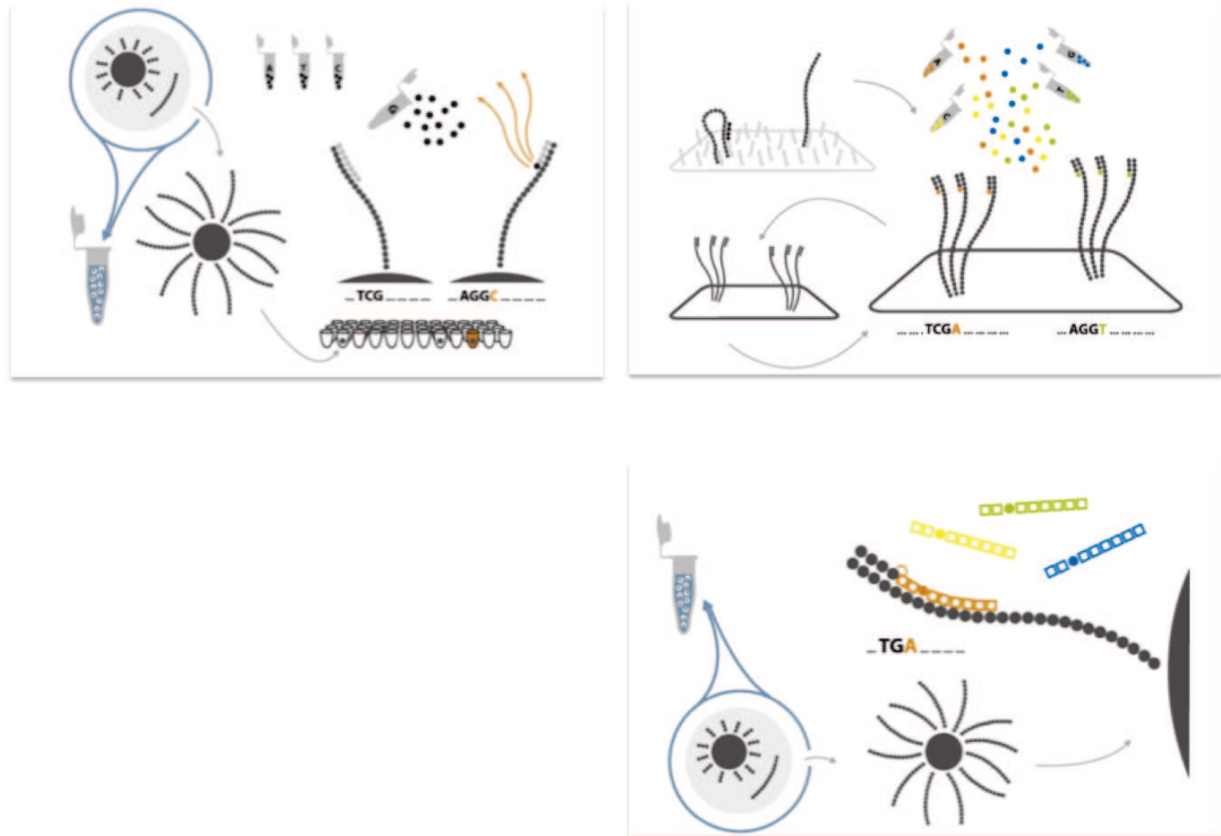


Figure I-5 : Séquençage de deuxième génération **a) 454-FLX, Roche** ; Après une PCR en émulsion, le pyroséquençage repose sur l'émission de photons lors de l'incorporation des nucléotides par une ADN polymérase. Une seule famille de nucléotides est utilisée par cycle, et la lumière émise et détectée par la caméra CCD est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. On peut ainsi savoir si le nucléotide présent correspondait à la séquence ou non. **b) Illumina/Solexa** ; Après PCR en pont, une ADN polymérase « copie » les molécules cibles. Chaque nucléotide est marqué par un fluorophore différent. Par lecture de la fluorescence, on découvre donc la séquence cible de proche en proche. **c) Applied Biosystems SOLiD**. Après 1 PCR en émulsion, de courtes séquences marquées par des molécules fluorescentes sont liées aux amorces par l'enzyme ADN ligase. Chaque molécule fluorescente correspond à un encodage de 2 bases. L'utilisation successive de chaque combinaison de bases permet de proche en proche de reconstituer la séquence cible par lecture de la fluorescence. (D'après Petterson et al., 2009).

Ces 3 méthodes ont révolutionné la biologie moléculaire, et ont nécessité le développement massif de la bioinformatique. En effet, ces séquençages massifs demandent de lire, traiter le signal, et stocker des données en quantité importante.

Un des premiers génomes anciens étudié fut celui du Mammouth laineux obtenu par pyroséquençage (Poinar, Schwarz et al. 2006). Le génome de l'homme de Néanderthal a également été analysé avec succès (Green, Krause et al. 2010).

II.4.2 Séquençage de molécules uniques

L'amplification par PCR préalable au séquençage entraîne parfois des erreurs dans les séquences. Les méthodes de séquençages de 3^{ème} génération se sont donc affranchies de cette étape d'amplification, tout en permettant le séquençage de molécules uniques (Gupta 2008). Helicos Heliscope lança par exemple en 2008 le système tSMSTM (true Single Molecule Sequencing). Après fixation du matériel à séquencer, une ADN polymérase le copie en incorporant des nucléotides marqués par une molécule fluorescente. Si un signal est observé à la lecture de la fluorescence, le nucléotide a été incorporé. Après clivage de la molécule fluorescente, on répète l'opération avec un nucléotide différent, et on obtient ainsi de proche en proche la séquence d'intérêt (**Figure I-6 a** pour plus de détails). Récemment, Orlando et al. (2011) et ont séquencé 1 molécule d'ADN de cheval provenant d'un os daté du Pléistocène par 2 méthodes de séquençage, Illumina et tSMSTM. Les meilleurs résultats furent obtenus par la méthode Helicos heliscope tSMSTM.

Pacific Biosciences a également développé une méthode de séquençage efficace, appelée SMRTTM (Single Molecule Real Time Sequencing). Cette méthode est encore plus rapide que les précédentes, et permet d'obtenir une quantité considérable de données en quelques minutes. Des séquences de plus en plus longues peuvent donc être analysées (Gupta et al., 2008). La réaction de séquençage s'effectue sur une lame de métal parsemée de cavités régulièrement espacées. Dans chaque cavité, une réaction de séquençage-par-synthèse opère : une ADN polymérase incorpore des nucléotides marqués chacun par un fluorophore spécifique. Les fluorophores sont clivés avant incorporation d'un second nucléotide (**Figure I-6 b**).

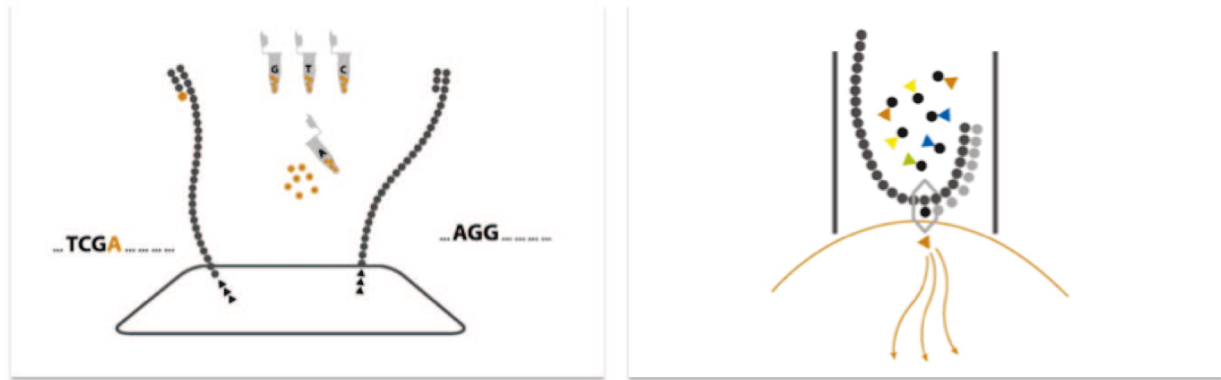


Figure I-6 : Méthodes de séquençage molécule unique a) Helicos heliscope tSMS™; b) Pacific biosciences SMRT (d'après Pettersson et al., 2009).

Toutes les méthodes de séquençage reposent sur l'utilisation d'une ADN polymérase, soit pour le séquençage lui même (séquençage par synthèse), soit pour une étape de PCR préalable.

II.5 Limitation des ADN-polymérases

Si l'analyse d'ADN ancien est de mieux en mieux comprise et de plus en plus efficace grâce au séquençage haut débit, de nombreux échantillons sont en apparence « stériles » et donnent lieu à un échec des amplifications et séquençage enzymatiques. En effet, les échantillons d'ADN anciens sont souvent dégradés, chimiquement modifiés, et cela complique l'obtention de séquences anciennes fiables, car les enzymes utilisées telles que la *Taq polymerase* sont sensibles à différents facteurs comme la présence d'inhibiteurs, de contaminants ou de lésions.

II.5.1 Présence d'inhibiteurs

Les enzymes de détection et d'amplification des molécules d'acides nucléiques sont très efficaces dans les conditions optimales mais voient leur activité diminuer en présence de substances dites inhibitrices. Ainsi, une absence totale d'amplification peut être observée (Wilson 1997), tout en n'étant pas liée à une absence d'ADN, mais à la présence d'inhibiteurs. Les inhibiteurs sont classés en 3 catégories (Radstrom, Knutsson et al. 2004).

- Inhibiteurs de l'ADN-polymérase : Un exemple souvent employé concerne les ions Mg^{2+} qui sont des co-facteurs essentiels de l'enzyme. Tout composé monopolisant le stock d'ions Mg^{2+} ou empêchant leur interaction avec l'enzyme inhibera l'ADN polymérase (Wilson 1997; Bessetti 2007)
- Ceux qui dégradent l'ADN ou se fixent sur l'ADN empêchant la « lecture » du brin par l'enzyme.
- Ceux qui interfèrent avec la lyse des cellules lors de l'extraction de l'ADN, et donc qui empêchent la libération de l'ADN.

De nombreux inhibiteurs ont été identifiés tels que les acides humiques trouvés dans les sols, le collagène, les protéines du lait, les polysaccharides, et bien d'autres encore (Radstrom, Knutsson et al. 2004; Teletchea, Maudet et al. 2005; Bessetti 2007). Leur mécanisme d'inhibition n'est pas systématiquement connu (Radstrom, Knutsson et al. 2004). Les inhibiteurs sont souvent co-extraits de l'échantillon avec l'ADN. Plusieurs solutions sont possibles afin de les éliminer. Il existe des kits de purification commerciaux (*e.g.* Promega, Qiagen) qui reposent usuellement sur la forte adsorption de l'ADN en surface de billes de silice permettant d'isoler l'ADN des contaminants et inhibiteurs. On peut répéter plusieurs fois l'étape d'extraction d'ADN sur silice pour optimiser la soustraction des inhibiteurs (Kemp, Monroe et al. 2006).

L'utilisation de la protéine BSA (Bovine Serum Albumin) lors de la réaction de PCR permet également de limiter les inhibitions (Kreader 1996), et est donc très utilisée lors de l'étude d'ADN ancien.

II.5.2 Contamination

Lorsque l'on travaille à l'amplification enzymatique d'un substrat ancien, le risque d'une contamination externe ne peut pas être négligé. En effet, les dégradations de l'ADN ancien le rendent difficile à analyser pour l'enzyme polymérase, qui a plus d'affinité pour une

molécule moderne présente dans le tube. Outre la possibilité d'une contamination inter-échantillon par aérosol lors de la préparation de plusieurs échantillons en parallèle, des contaminants universels (Bœuf, Porc, Mouton, Homme...) présents dans l'atmosphère ou sur l'expérimentateur peuvent être amplifiés. Ceci a parfois donné lieu dans les années 1990 à des conclusions hâtives et erronées. Woodward et al. (1994) prétendent avoir analysé une séquence d'ADN de dinosaure du Crétacé (**65 Ma**). Rapidement, d'autres études prouvent que cette séquence est en réalité une séquence de mammifère, plus particulièrement d'ADN mitochondrial humain (Zischler, Hoss et al. 1995). La recherche d'ADN d'âge « géologique » continue cependant, avec des découvertes pas toujours confirmées (Hebsgaard, Phillips et al. 2005). Des erreurs rencontrées lors de cette « course à l'ADN le plus vieux » a émergé la nécessité de mettre au point des règles strictes afin d'éviter les contaminations, de s'assurer de l'endogénicité et de l'authenticité des séquences obtenues lors de l'analyse d'ADN ancien (Cooper and Poinar 2000). Ces règles sont appliquées strictement sur la plateforme de paléogénétique de Lyon.

II.5.3 Incapacité à traiter certaines lésions

Malgré toutes les précautions prises, la PCR n'aboutit pas pour une large variété d'échantillons. Cela ne signifie cependant pas forcément que l'ADN cible n'est pas présent dans l'échantillon. En effet, une limitation majeure des ADN-polymérases est leur incapacité parfois, ou tout du moins leur difficulté à traiter un substrat dégradé. L'ADN cible peut donc être présent dans l'échantillon, peut être même en quantité importante sans être accessible à l'analyse enzymatique. Il existe 2 types de lésions.

- Lésions non-bloquantes

Elles n'empêchent pas la lecture de la molécule ni son amplification, mais elles entraînent des erreurs dans la séquence finale (Hofreiter, Paabo et al. 2001; Briggs, Stenzel et al. 2007). Ces modifications chimiques subies par les bases entraînent des mésappariements ; or, la *Taq*-

polymérase ne dispose pas d'un système de lecture et de correction des erreurs au fil de l'élongation.

Dans des substrats anciens, la lésion la plus courante entraînant un mésappariement est la désamination de la cytosine, formant alors une Uracile (**Figure I-3**). L'ADN-polymérase place alors une Adénosine en face de cette Cytosine désaminée à la place d'une Guanosine. La transition de C vers U dans la molécule « modèle » entraîne donc une transition de G vers A dans la nouvelle molécule.

Les cytosines ont également tendance à se « méthyliser » au niveau du carbone 5 (10 à 30% des cytosines dans une cellule vivante (Brown 2011)). Si la base 5-méthyl-Cytosine s'apparie toujours avec la Guanosine, elle est encore plus sujette à la désamination que ne l'est la Cytosine. Le résultat de la désamination d'une Cytosine méthylée est une Thymine ; on observe donc beaucoup de transitions C vers T dans le substrat, et donc d'autant plus d'erreurs de codage de G vers A dans la séquence amplifiée.

D'autres bases modifiées sont également responsables de mésappariement et d'erreurs de codage. Le résultat de la désamination d'une Adénine, appelée Hypoxanthine, s'appariera ainsi plus volontiers avec une Cytosine qu'une Thymine. Ces modifications de séquences sont cependant beaucoup moins fréquentes dans l'ADN ancien que la désamination de C vers U ; elles ne représentent que 2 à 3% de la désamination de la cytosine (Brown 2011). Toutes les désaminations ne sont cependant pas à l'origine d'erreurs de codage ; par exemple la Xanthine, produit de désamination de la Guanosine, s'apparie bien avec la Cytosine et n'entraîne donc pas de modifications dans la séquence finale.

L'oxydation des bases peut également entraîner un « miscoding ». Par exemple, la 8-Hydroxyguanine s'apparie avec l'Adénine et non avec la Cytosine (Cheng 1992) ; on observe donc des transitions de G vers T dans les séquences amplifiées.

Parmi toutes les lésions non-bloquantes, Brotherton et al. (Brotherton 2007) suggèrent que seule les désaminations de C en U entraîne une quantité importante de modifications, les autres étant plus anecdotiques.

- Lésions bloquantes

Parmi les produits d'une réaction de PCR sur un échantillon dégradé ou ancien, il n'est pas rare d'obtenir des séquences plus courtes que la séquence ciblée, ou de n'obtenir aucune amplification. Des lésions de l'ADN peuvent stopper l'élongation de la molécule par l'ADN polymérase, bloquant ainsi la réaction de PCR. On les appelle les lésions bloquantes.

La fragmentation des molécules peut bien sûr être responsable de l'obtention d'amplicons plus courts que la séquence cible. On prend donc soin de cibler des fragments courts de l'ordre de 200 bp. Plusieurs types de modifications oxydatives des bases azotées bloquent l'élongation de la molécule d'ADN par la *Taq*-polymérase (Höss et al., 1996), dont les **pyrimidines oxydées**, ou **hydantoïnes**. L'abondance d'hydantoïnes dans les échantillons, par exemple, est corrélée à l'inefficacité de la PCR à amplifier les séquences en présence (Heyn, Stenzel et al. 2010). D'autres bases modifiées telles que la 8-oxo-7,8-dihydro-20-deoxyadenosine réduisent également drastiquement l'efficacité de la PCR de plus de 85% (Sikorsky, Primerano et al. 2004).

Les **crosslinks**, intermoléculaires ou intramoléculaires, sont également des lésions bloquantes formées par alkylation ou par la réaction de Maillard (Willerslev et Cooper, 2005). Ces dernières sont des blocages mécaniques au traitement des molécules par la *Taq*-polymérase (Willerslev et Cooper, 2005 ; Pääbo et al., 2004).

Enfin, de nombreuses études montrent que la présence de **sites abasiques**, résultats de la dépyrimidination et surtout de la dépurination, bloque l'activité de l'enzyme (McDonald, Hall et al. 2006). Le résultat d'amplification de substrat contenant des sites abasiques dépendra du type d'enzyme utilisé et de sa sensibilité vis à vis de telles lésions. Schaaper et al. (1983)

étudient la polymérase *E. coli* ADN I, et observent que plus la quantité de sites abasiques augmente, plus l'enzyme peine à traiter les molécules, abaissant l'efficacité d'amplification. Sikorsky et al. (2004, 2007) observent que l'efficacité de la PCR par Taq polymérase est réduite de 95 à 98% par la présence d'un seul site abasique. Dans les deux cas, les séquences obtenues ne sont pas fidèles au substrat initial et contiennent des erreurs de codage et des suppressions de bases (Schaaper, Kunkel et al. 1983; Shibutani, Takeshita et al. 1997; Sikorsky, Primerano et al. 2007). Haracska et al. (2001) montrent que l'ADN-polymérase η est incapable de traiter des molécules d'ADN contenant un site abasique.

La présence de lésions bloquantes comme les sites abasiques ou les coupures de brins favorise également la « jumping PCR » (Paabo, Irwin et al. 1990), un artéfact d'amplification pouvant entraîner la synthèse de séquences plus longues que la séquence ciblée (**Figure I-7**, d'après Orlando et Hänni, 2000). La Jumping PCR peut également contribuer aux erreurs de séquence (Hofreiter et al., 2001).

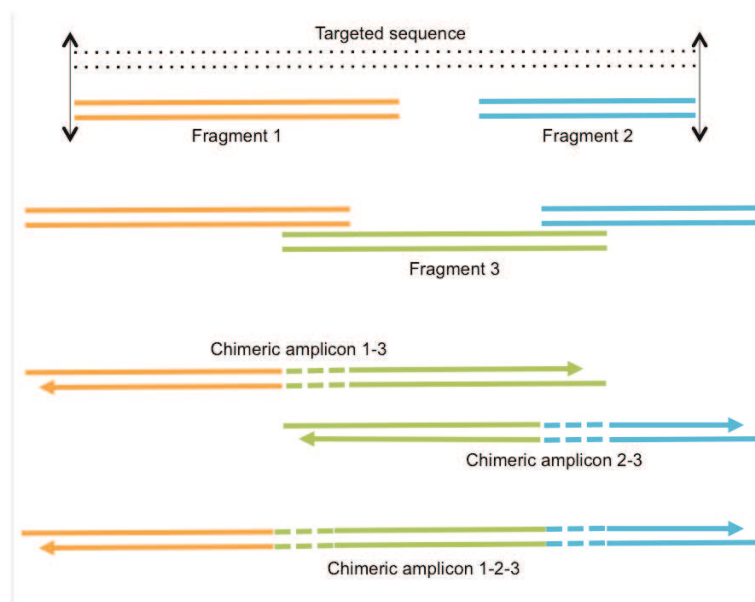


Figure I-7 : Jumping PCR, artéfact d'amplification fréquent dans l'étude d'ADN ancien (d'après Pääbo et al., 1990 et Orlando et Hänni, 2000). Le fragment ciblé n'est pas forcément présent dans l'échantillon. L'ADN polymérase va donc créer des molécules chimères en combinant plusieurs fragments qui se recoupent. Le résultat d'amplification peut par conséquent être plus long que la séquence ciblée.

III. Peut-on s'affranchir des limitations enzymatiques?

Plusieurs solutions sont envisageables pour obtenir la séquence authentique malgré les dégradations de l'ADN.

III.1 Fragmentation

Il est parfois possible d'obtenir la séquence cible malgré la fragmentation des molécules. Pour cela, de nombreuses réactions de PCR indépendantes doivent être réalisées. Les produits de PCR sont ensuite séquencés et alignés. Des fragments se superposent partiellement, et on peut ainsi remonter de proche en proche à la séquence authentique (Paabo, Poinar et al. 2004). La comparaison systématique de toutes les séquences obtenues permet de juger de la fidélité de la réaction de PCR quant à l'incorporation correcte des nucléotides malgré les lésions.

On notera qu'il est nécessaire d'obtenir une amplification, même d'efficacité très faible, pour pouvoir appliquer cette méthode, sans garantie de résultats cependant. La présence de lésions bloquantes dans le substrat initial peut empêcher toute amplification.

III.2 Crosslinks

Il est possible de briser certains crosslinks en traitant l'échantillon avec du **N-phenacylthiazolium bromide**, un réactif clivant les sucres et produits dérivés de la réaction de Maillard (Vasan, Zhang et al. 1996). Ainsi, des restes anciens n'ayant pas donné de résultats positifs d'amplification jusqu'alors ont pu être amplifiés, comme des os de l'homme de Néandertal *Homo neanderthalensis* datés de 42 ka (Krings, Capelli et al. 2000) ou des coprolithes datés de 20 ka (Poinar, Hofreiter et al. 1998). Le mécanisme de cette réaction de clivage n'est pas encore totalement élucidé (Willerslev et Cooper, 2005). Cette méthode, bien qu'efficace, ne peut être utilisée qu'*a priori* sur des échantillons d'ADN dont on n'obtient pas d'amplification. Il n'y a aucune garantie que les lésions bloquant l'amplification soient effectivement des crosslinks, et qui plus est, que ces crosslinks ne soient pas dus à des

protéines ou des acides gras.

III.3 Réparation enzymatique de l'ADN

Les cellules vivantes possèdent une armée d'enzymes dédiées à la réparation de l'ADN. Certains processus de réparation enzymatique ont pu être appliqués à des molécules d'ADN ancien, afin d'en améliorer la qualité avant d'effectuer des PCR.

- Réparation par pré-amplification

Golenberg et al. (1996) ont démontré qu'il était possible d'améliorer les résultats de PCR en pré-traitant l'ADN par « polymérisation reconstructive ». En l'absence de primers spécifiques, l'ajout de *Taq-polymérase* pourra compléter les molécules dégradées (**Figure I-8**).

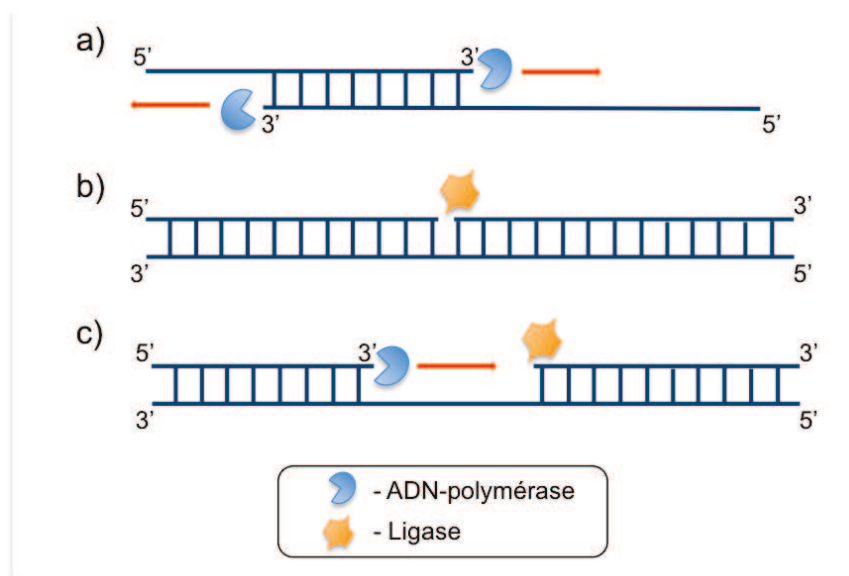


Figure I-8: Reconstruction enzymatique par polymérisation a) par action d'ADN polymérase uniquement, b) par action de ligase uniquement, ou c) par action conjointe des 2 enzymes. (d'après Pusch et al., 1996 ; Di Bernardo et al., 2002).

Imitant ce principe, une autre méthode de restauration d'ADN dégradé a été mise au point afin de compléter les morceaux d'ADN manquant liés à la perte de bases et aux coupures simple-brin subies par les acides nucléiques. L'ADN-polymérase *E. coli* I remplit les « trous » et une ligase est utilisée pour fermer les coupures simple-brin (Pusch, Giddings et al. 1998; Di

Bernardo, Del Gaudio et al. 2002). Cette méthode de réparation a par exemple permis l'amplification avec succès d'ADN d'os d'équidés de Pompéi datés de 79 A.D. (Pusch et al., 1996), augmentant le taux de succès de 22 à 80 %.

Mitchell et al. (2005) proposent de faire agir d'autres enzymes comme l'oxyganine glycosylase ou l'uracile glycosylase en complément de cette restauration afin d'extraire certaines bases modifiées.

Redrejo et al. (2011) proposent récemment d'appliquer à l'ADN ancien une voie de réparation d'ADN utilisée dans les cellules vivantes, afin d'exciser les hydantoïnes et les pyrimidines oxydées avant réparation. Le chemin BER (Base Excision Repair) repose sur l'excision de la base modifiée, reconnue par une ADN-glycosylase, suivie par le remplissage du site abasique formé.

- Élimination des erreurs liées aux Cytosine désaminées

Deux stratégies sont appliquées afin de supprimer l'Uracile dans les molécules d'ADN ancien. D'une part, des polymérases incapables de traiter les Uraciles, comme la polymérase Phusion®, ont été utilisées avec succès par Rasmussen et al. (2010) pour le séquençage d'ADN d'*Homo sapiens* ancien à partir de mèches de cheveux de paléo-esquimaux. L'utilisation de ces enzymes limite l'accès aux molécules ou aux parties de molécules ne contenant pas d'Uracile.

D'autre part, les résidus Uracile peuvent être retirés des molécules dégradées. L'Uracile-N-glycosylase (UNG) est capable de reconnaître et cliver les Uraciles d'une molécule d'ADN, laissant des sites abasiques. Cette propriété a été mise à profit afin d'éliminer les produits de désaminations des Cytosines, notamment par Hofreiter et al. (2001) et Gilbert et al. (2003). Elle permet de réduire les artefacts causés par la présence d'Uracile dans les séquences d'ADN ancien. Cependant, cette approche crée des sites abasiques, lésions bloquant la PCR, et on obtient donc des séquences dépourvues des erreurs dues à la présence d'Uracile, mais

plus courtes ou en moins grande quantité à cause de la présence de site abasique. L'UNG n'est donc pas utilisée systématiquement dans l'analyse d'ADN ancien, car elle risque de rendre l'ADN non-amplifiable par PCR et donc non-détectable.

D'autres enzymes impliquées dans les systèmes de réparation intracellulaire peuvent être utilisées, notamment les endonucléases. Chez *E. coli* par exemple, l'endonucléase IV reconnaît les sites abasiques et clive la molécule d'ADN du côté 5' du site abasique (Haring, Rudiger et al. 1994). Briggs et al. ont utilisé conjointement l'UNG et l'endonucléase VIII afin d'éliminer les Uraciles tout en réparant les sites abasiques résultant de l'action de l'UNG (Briggs, Stenzel et al. 2010). L'endonucléase VIII clive les molécules d'ADN des 2 côtés des sites abasiques formés (**Figure I-9**).

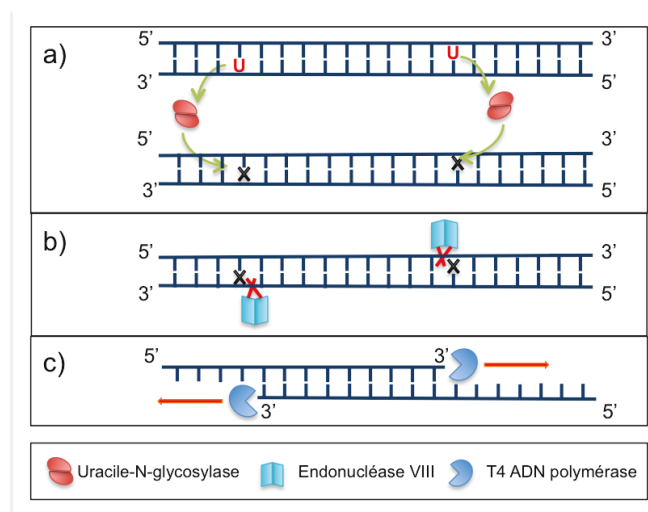


Figure I-9 : Exemple de réparation d'ADN par action conjointe de 2 enzymes, l'uracile-N-glycosylase et l'endonucléase VIII (d'après Briggs et al, 2010). a) Après phosphorylation des extrémités 5' par l'enzyme T4 PNK phosphorylase, Les résidus Uracile sont clivés par l'Uracile-N-Glycosylase ; b) L'endonucléase VIII coupe la molécule d'ADN de chaque côté du site abasique résultant ; c) la PNK clive les éventuels groupes phosphate en 3', permettant à la T4 polymérase de remplir les trous. Les adaptateurs nécessaires au séquençage par 454 seront par la suite liés par ligase.

Avant de débuter une procédure de réparation d'ADN, il est possible d'évaluer le taux de lésions d'un échantillon, soit en prenant en compte les conditions de préservation comme son âge thermique (Molak and Ho 2011), soit en réalisant une première série de PCR/séquençage

sur l'échantillon. Si un amplicon est obtenu, un programme de bioinformatique tel que mapDamage (Ginolhac, Rasmussen et al. 2011) reconnaît les « patterns » de dégradation de l'ADN, tels que la fragmentation, les mis-incorporations. Cela permet de juger de l'authenticité des séquences obtenues, ainsi que de la quantité et du type de dommages. On peut ainsi orienter les réparations de l'ADN à réaliser. Cependant, cela n'est réalisable que sur de l'ADN que les polymérases ont pu amplifier, c'est à dire ne contenant que des lésions non-bloquantes.

La connaissance limitée des chemins de dégradation des acides nucléiques rend très difficile les prédictions quant au contenu d'un échantillon, tant au niveau de la qualité que de la quantité d'ADN. Pour optimiser les chances de réparation de l'ADN, il faudrait idéalement lancer toutes les procédures de réparation. Or des échantillons peuvent ne pas contenir d'ADN. Beaucoup de temps et d'argent sont donc parfois dépensés sans toutefois obtenir au final de résultat probant.

III.4 De nouvelles enzymes plus performantes

La réparation de l'ADN reste à ce jour compliquée et peu utile si la molécule à réparer n'est pas « lisible » par les polymérases. Cela a suscité l'émergence de nouvelles enzymes chimériques, plus performantes (Shapiro 2008).

McDonald et al. (2006) ont identifié une nouvelle famille de polymérases, « Y-family polymerase » qui peuvent traiter une grande variété de lésions de l'ADN. Mais si l'efficacité d'amplification augmente, ces enzymes sont significativement moins fidèle au substrat initial que ne le sont les polymérases classiques de la famille A (Shapiro 2008).

De nouvelles polymérases, capables de traiter des molécules contenant des sites abasiques et des hydantoïnes, ont également été développées en se basant sur les gènes codant pour la *Taq*-polymérase (d'Abbadie, Holliger et al. 2007; Gloeckner, Sauter et al. 2007). Ces enzymes sont effectivement plus efficaces que celles classiquement utilisées en PCR pour certains

échantillons, mais cette hausse d'efficacité n'est pas garantie, notamment lors de l'étude d'ADN ancien (Heyn et al., 2010). De plus, la fidélité de ces enzymes par rapport au substrat initial n'est pas optimale, ces enzymes ont tendance à incorporer préférentiellement de l'Adénine en face des lésions, ce qui augmente les incertitudes dans les séquences obtenues (Shapiro, 2008 ; Heyn et al., 2010).

Ainsi ni la réparation enzymatique ni le développement d'enzymes plus performantes ne règlent totalement les problèmes intrinsèques à l'utilisation d'enzymes. Il est donc souhaitable de disposer d'une méthode de détection non-enzymatique, permettant de connaître rapidement le contenu d'un échantillon avant de se lancer dans les procédures complexes de la réparation et de l'amplification.

IV. Nécessité d'une méthode non-enzymatique de détection d'ADN

La spectroscopie Raman exaltée, ou SE(R)RS (**Surface Enhanced (Resonant) Raman Scattering**), dérive de la spectroscopie Raman classique, associant des signatures moléculaires spécifiques et une sensibilité accrue. Des développements successifs permettent la détection de molécules spécifiques à des concentrations très faibles approchant de la molécule unique (Nie and Emery 1997; Maher, Etchegoin et al. 2002; Kneipp, Kneipp et al. 2008). Plus sensible que la fluorescence (Faulds, Graham et al. 2004; Sabatte, Keir et al. 2008), le SERRS apparaît comme une excellente alternative aux problèmes enzymatiques inhérents à la PCR, puisque le SERRS permettrait la détection d'ADN sans nécessité d'une amplification préalable. De plus, les raies Raman mieux résolues que les bandes de fluorescence (Docherty, Smith et al. 2004) permettent de réaliser des détections multiples sans séparation chimique toujours susceptible d'entraîner des pertes de matériel, ou des contaminations.

IV.1 Bases du SE(R)RS

IV.1.1 Effet Raman

L'effet Raman, ou diffusion Raman (Raman scattering), a été découvert en 1928 par Chandrashekhara Venkata Râman (Raman and Krishnan 1928). Reposant sur la diffusion inélastique de la lumière, la spectroscopie Raman est une spectroscopie vibrationnelle, au même titre que la spectroscopie Infrarouge. Rapide et non-destructrice, la spectroscopie Raman permet de caractériser la structure et la composition moléculaire des matériaux analysés (Vo-Dinh, Stokes et al. 1999). Elle est utilisée dans des domaines variés, que ce soit pour la recherche fondamentale (*e.g.* (Griffith 1969; Picard, Daniel et al. 2007) la médecine (Kneipp, Kneipp et al. 1999), la médecine légale (Ali, Edwards et al. 2008) ou la pharmacie (Vankeirsbilck, Vercauteren et al. 2002).

Lors de l'interaction entre un faisceau lumineux incident et la matière, la majorité des photons diffusés sont de même fréquence que la lumière incidente ; ils ont subi une diffusion élastique, appelée diffusion Rayleigh (**Figure I- 10**). Une très faible proportion du faisceau incident, moins d'un millionième de son intensité, gagne ou perd de l'énergie. Cela traduit un processus de diffusion inélastique de la lumière par l'échantillon : c'est l'effet Raman.

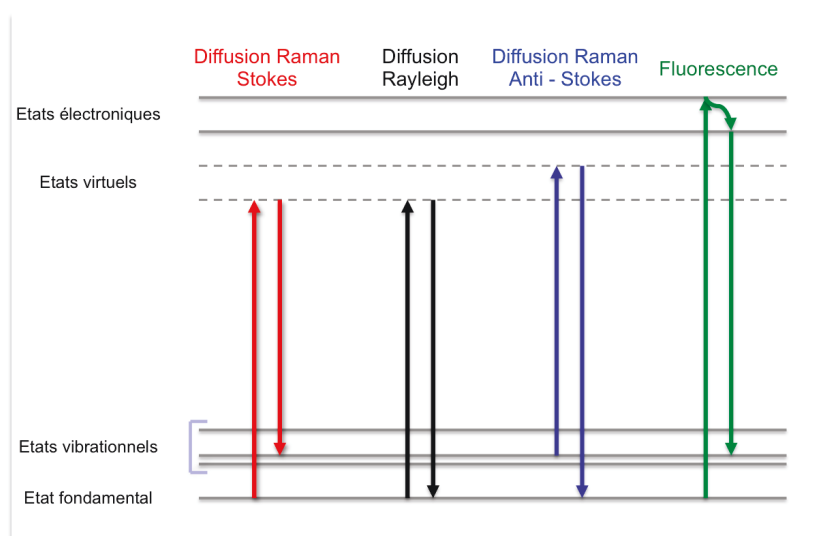


Figure I - 10: Diagramme énergétique de Jablonski (modifié d'après www.horiba.com)

Les raies Raman ayant perdu de l'énergie par rapport à la radiation incidente sont appelées raies Stokes, décalées vers les longueurs d'ondes rouges de plus faible énergie. Les raies Raman ayant gagné de l'énergie sont les raies Anti-Stokes, décalées vers les longueurs d'onde bleues de plus forte énergie. La diffusion Raman Anti-Stokes est plus faible que la diffusion Raman Stokes, et on étudie donc généralement les raies Stokes, de plus grande intensité.

La différence d'énergie entre l'énergie incidente et l'énergie réémise signe une vibration interatomique dont la fréquence n'est pas dépendante de la longueur d'onde de la lumière incidente mais de la nature de la liaison interatomique visée.

IV.1.2 Exaltation de surface : effet SERS

Le signal Raman est très faible, mais son intensité peut être augmentée de 6 ordres de grandeur si le composé d'intérêt est adsorbé sur une **surface métallique rugueuse** (e.g. (Graham, Smith et al. 1997; Vo-Dinh, Stokes et al. 1999; Maher, Etchegoin et al. 2002; Otto 2005; Howes, Scatragli et al. 2006). Cet effet d'amplification de surface constitue l'effet **SERS** (Surface-Enhanced Raman Scattering) observé pour la première fois en 1974 lors de l'étude de l'adsorption de la pyridine sur une électrode d'argent (Fleischm.M, Hendra et al. 1974). L'amplification du signal est due à un effet électromagnétique majoritaire, et à un effet électrochimique moins bien compris à ce jour.

L'effet électromagnétique est lié à une amplification locale du champ électrique au niveau de la surface métallique (Moskovits 1985; Moskovits 2005; Stiles, Dieringer et al. 2008; Halvorson and Vikesland 2010).

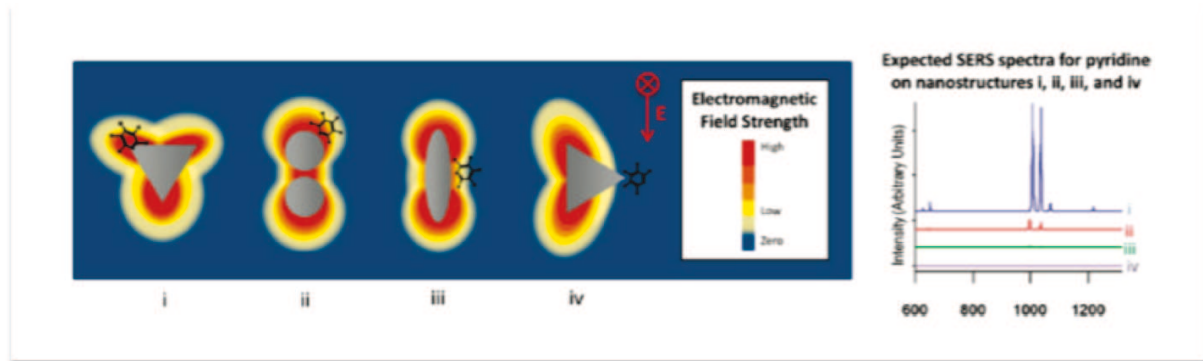


Figure I - 11 : Amplification du champ électromagnétique en surface de nanoparticules métalliques de formes variées sous l'excitation par l'onde électromagnétique E. L'intensité attendue des spectres SERS est également représentée (Halvorson et al., 2010)

Cette amplification du champ électrique est principalement liée à la géométrie de la surface métallique : des régions de haute amplification, appelés points chauds, se constituent localement sous l'effet de l'excitation par une onde électromagnétique (**Figure I – 11 i**). Cet effet de pointe est parfois appelé « lightning rod ». La position de ces points chauds en surface des particules dépend de la forme et de la taille des particules, mais également de leur orientation par rapport à l'onde incidente. On observe également un très fort champ électromagnétique entre 2 particules très proches. L'amplification du champ magnétique est un phénomène local, et l'intensité du champ décroît très rapidement lorsque l'on s'éloigne de la surface.

A l'effet d'antenne ou de pointe décrit ci-dessus s'ajoute l'excitation par l'onde électromagnétique des **plasmons de surface**, oscillation des électrons de valence due au champ magnétique (e.g. Stiles et al., 2008 ; Moskovits 2005). Si la fréquence d'oscillation des plasmons dipolaires est en résonance avec la fréquence de la lumière incidente, le champ électromagnétique local au niveau de la surface métallique est amplifié. Il est important que la taille des nanostructures de la surface métallique soit inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente (Moskovits, 1985 et 2005). Si les nanostructures sont trop petites, leur conductivité est moindre et il n'y a pas de résonance de plasmon dipolaire. Si les

nanosstructures sont trop grosses, les plasmons multipolaires sont principalement excités mais ils induisent une amplification bien moindre (Moskovits 2005). La résonance du plasmon dipolaire de surface dans le cas d'une particule métallique sphérique est représentée en **Figure I- 12**.

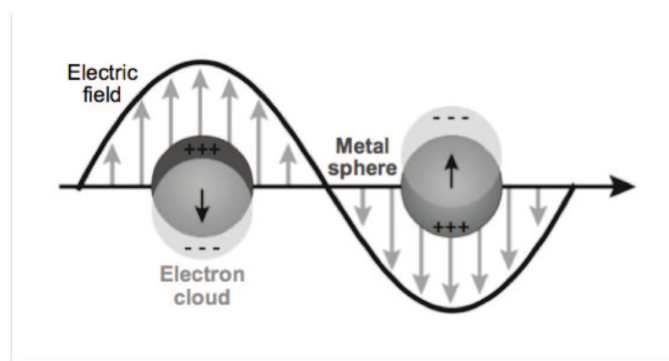


Figure I- 12 : Résonance du plasmon dipolaire de surface (extrait de Stiles et al., 2008).

Les systèmes actifs en SERS fonctionnent généralement sur des particules / rugosités de tailles comprises entre 5 et 100 nm (Moskovits, 2005).

L'effet électrochimique induit une amplification plus faible que l'effet électromagnétique. Il naît des interactions électroniques entre la molécule adsorbée et le métal (Moskovits 1985 ; Vo-Dinh et al., 1999, Maher et al., 2002; Moskovits 2005 ; Otto et al. 2005 ; Stiles et al., 2008). Un complexe à transfert de charges se formerait entre les molécules adsorbées et la surface métallique. L'effet électrochimique n'est pas encore totalement élucidé, mais il pourrait expliquer que certaines molécules bénéficient d'une amplification SERS plus intense que d'autres.

IV.1.3 Résonance

Il est possible d'obtenir une amplification encore plus importante du signal, allant jusqu'à 14 ordres de grandeur (*e.g.* Maher et al., 2002) si la longueur d'onde d'excitation est suffisamment proche de la longueur d'onde d'absorption maximale de l'analyte qui entre alors en résonance (Graham, Smith et al. 1997; Graham, Mallinder et al. 2000; Faulds, Barbagallo et al. 2004;

Faulds, Graham et al. 2004). Cet effet est appelé **SERRS** (Surface Enhanced **R**esonant Raman Scattering) et permet de travailler à de très faibles concentrations et dans certains cas sur une molécule unique (review par Kneipp 2008). L'effet de la résonance et donc la différence entre SERS et SERRS est illustré dans la **Figure I – 13**.

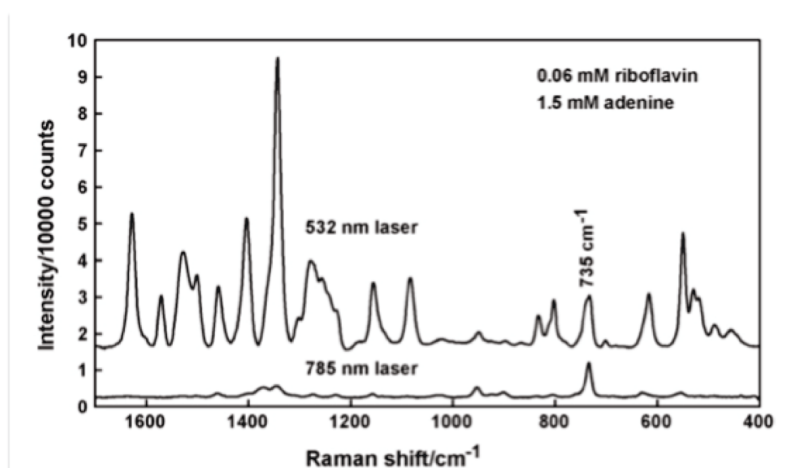


Figure I – 13 : Spectres SERS d'un mélange d'adénine et de riboflavine, acquis avec une longueur d'onde d'excitation de 785 et 532 nm (Smith-Palmer, Douglas et al. 2010).

Un mélange d'adénine et de riboflavine est analysé par SERS avec deux longueurs d'ondes d'excitation différentes, 785 et 532 nm. Pour $\lambda_0 = 785$ nm, le spectre SERS est dominé par le signal de l'adénine caractérisée notamment par un pic centré à 735 cm^{-1} . Quand $\lambda_0 = 532$ nm, la riboflavine bénéficie de l'effet de résonance et domine le spectre Raman. Le signal SERRS de la riboflavine est caractérisé par des pics très intenses notamment à 1590 et 1450 cm^{-1} . La contribution de l'adénine au signal est négligeable.

Dans la littérature, la distinction SERS vs SERRS n'est pas toujours utilisée. Par exemple, Nie et Emory (1997) rapportent la détection d'une molécule de Rhodamine 6G (R6G) en SERS avec une longueur d'onde d'excitation de 514.5 nm très proche de la longueur d'onde d'absorption maximale de la R6G de 524 nm (Graham and Faulds 2008). La R6G est donc en résonance lors de la mesure, et l'amplification du signal Raman correspond à un effet SERRS. Les mesures réalisées au cours de mon travail de thèse ont été effectuées spécifiquement dans

des conditions d'amplification de surface résonante afin d'obtenir le signal le plus intense possible.

IV.1.4 Substrats SERS

Toute surface métallique peut donner lieu à une amplification SERS, mais tous les métaux n'offrent pas les mêmes performances. Plus le métal est conducteur, plus l'amplification sera grande. Ainsi, les métaux alcalins, **l'or** et **l'argent** sont les meilleurs candidats, suivis par l'aluminium et le cuivre (Moskovits 2005; Rycenga, Cobley et al. 2011). Si l'or est parfaitement biocompatible, l'argent offre une meilleure amplification, et est environ 10 fois moins cher (Rycenga et al., 2011). On tendra donc à choisir l'argent.

Les substrats SERS doivent présenter une surface nanostructurée de forme et de taille appropriée et contrôlée. Le principal défi consiste donc à obtenir des surfaces reproductibles. Des balbutiements de la méthode à aujourd'hui, de nombreuses solutions ont émergé grâce aux avancées des nanotechnologies donnant lieu à l'obtention de surfaces nanostructurées maîtrisées. La gamme de substrats SERS a ainsi été élargie (Moskovits 1985; Vo-Dinh, Stokes et al. 1999; Banholzer, Millstone et al. 2008; Stiles, Dieringer et al. 2008). Un résumé des substrats SERS les plus utilisés est présenté en **Figure I - 14**.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour obtenir des surfaces rugueuses. Des films métalliques peuvent être déposés sur une lame de verre, formant ainsi des petits îlots de métal de 5 à 20 nm (Moskovits 1985; Fan, Andrade et al. 2011). Pour obtenir des nanostructures plus régulières et maîtrisées, on utilise la lithographie sur nanosphères (**Figure I-14**) (Haynes and Van Duyne 2001). Des nanobilles de polymères sont déposées sur un substrat (une lame de verre par exemple) puis du métal est déposé sur ce réseau hexagonal de billes, soit dans les espaces intersphériques afin de créer des triangles (15-100 nm), soit par-dessus les sphères en un tapis de 200 nm (Haynes et Van Duyne, 2001 ; Stiles 2008).

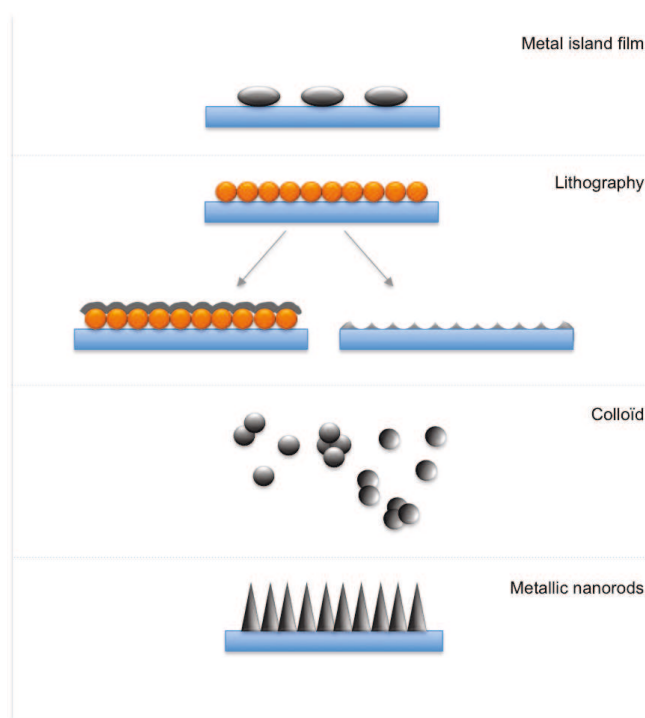


Figure I - 14 : Principaux types de surfaces actives pour le SERS (D'après Vo-Dinh et al, 1999, Stiles et al., 2008 ; Shanmukh et al., 2006 ; Wang et al., 2007 ; Banholzer et al, 2008)

On a aussi pu voir émerger des réseaux de pointes métalliques (**Figure I-14**) (Shanmukh, Jones et al. 2006; Wang, Pile et al. 2007). Des substrats actifs en SERS peuvent aussi être déposés à l'intérieur de fibres optiques, créant ainsi un nouveau type de capteur (Stokes and Vo-Dinh 2000).

Les surfaces actives en SERS peuvent également se présenter sous une forme de suspension colloïdale (Creighton, Blatchford et al. 1979; Lee and Meisel 1982; Vo-Dinh, Stokes et al. 1999; Littleford, Dent et al. 2004). Différentes formes de particules peuvent être obtenues (voir rev. par Rycenga et al., 2011). Zhang et al. (2010) réussissent par exemple à synthétiser des nanocubes d'argent, dont la taille influence la réponse spectrale des colloïdes ; plus le cube est grand plus l'amplification est forte (**Figure I-15**).

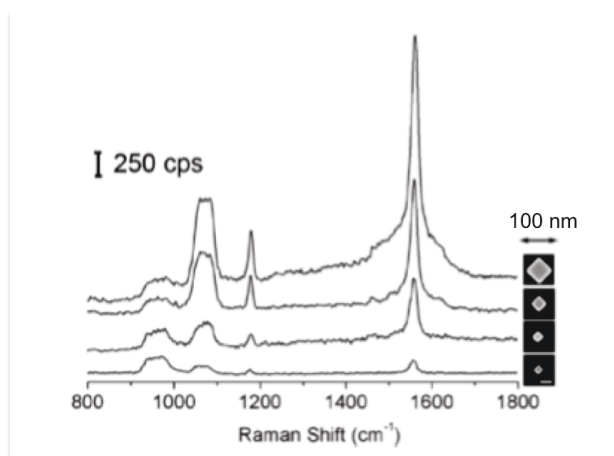


Figure I-15 : Spectres SERS de la molécule 1,4-Benzènedithiol obtenus avec des nanocubes d'argent avec des tailles différentes de 57, 82, 125, 170 nm respectivement de bas en haut (d'après Zhang et al, 2010).

Les colloïdes d'argent les plus utilisés sont de type Creighton (Creighton, 1979) ou de type Lee & Meisel (Lee et Meisel, 1982), et présentent des particules sphériques ou pseudo-sphériques (**Figure I-16**).

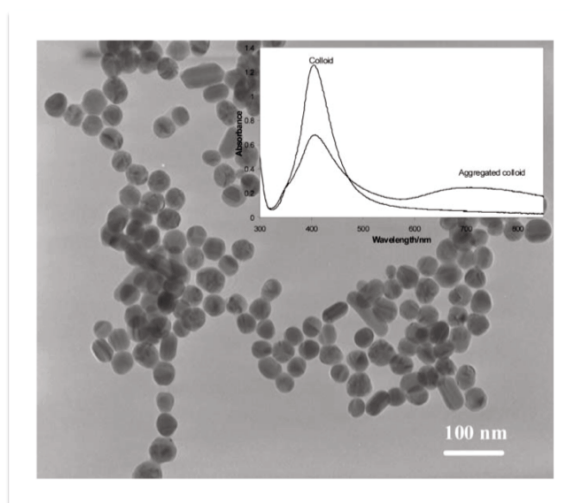


Figure I-16 : Image en microscopie électronique à transmission d'un colloïde d'argent synthétisé par la méthode de Lee et Meisel (1982). La réponse spectrale de ce colloïde est également représentée.

Ces suspensions colloïdales sont faciles à synthétiser par réduction de nitrate d'argent et sont peu onéreuses. De plus, ce substrat SERS a jusqu'à présent montré la meilleure amplification du signal (Strelau, Kretschmer et al. 2010). C'est donc le substrat le plus utilisé (Faulds, Graham et al. 2004; Chourpa, Lei et al. 2008; Cialla, Marz et al. 2012). Les particules d'un

colloïde peuvent s'agréger en « clusters » sous l'action d'agents agrégateurs par perturbation de la couche de solvation des particules métalliques. Des « hot spots », ou sites très actifs, sont créés localement. Faulds et al. (2004) rapportent une amplification du signal par un facteur 6. Plusieurs composés peuvent servir d'agent agrégateur tels les sels NaCl, Na₂SO₄, ou des molécules organiques comme la spermine (Graham et al., 1997).

IV.2 SE(R)RS et acides nucléiques

Les acides nucléiques sont détectés par spectroscopie SE(R)RS selon deux techniques distinctes. Soit les molécules d'ADN/ARN sont détectées directement sans marquage, auquel cas la détection se fait par **SERS** jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10⁻⁶ M (Bell and Sirimuthu 2006) pouvant atteindre 2-20 pM (Prado, Daugey et al. 2011). Soit les molécules d'ADN à détecter sont marquées par des marqueurs SERRS résonants sélectionnés pour leur structure et leur longueur d'onde d'absorption, et qui permettront une détection de l'ADN par **SERRS** jusqu'à des concentrations très faibles de l'ordre du pM (*e.g.* Faulds et al., 2004).

IV.2.1 Détection d'acides nucléiques par SERS

Sans marquage, c'est le signal intrinsèque des molécules d'acides nucléiques qui est mesuré. Chaque nucléotide présente un signal SERS spécifique (Bell and Sirimuthu 2006), ce qui permet de les identifier à des concentrations inférieures à 1 µg/ml (**Figure I - 17**).

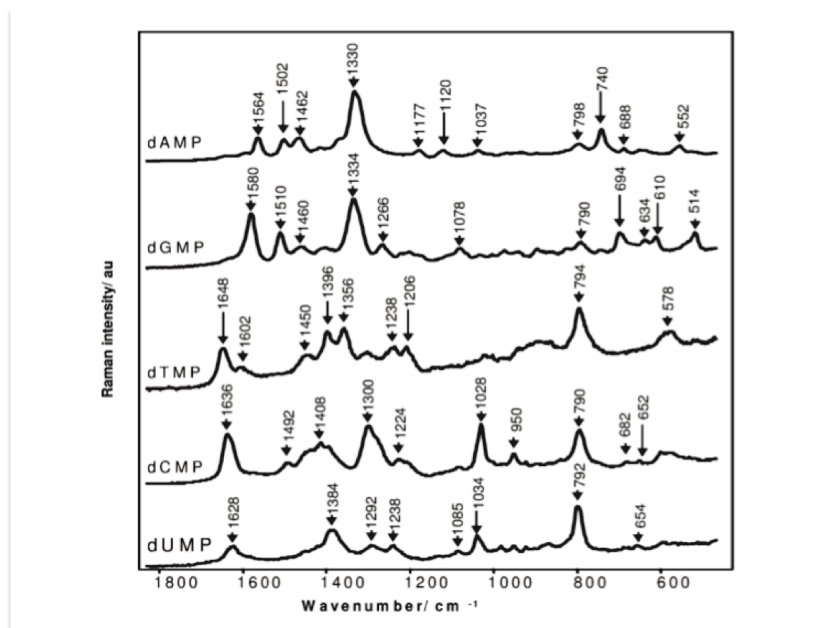


Figure I - 17 : Spectres SERS des mononucléotides dAMP, dGMP, dTMP, dCMP et dUMP (extrait de Bell et al., 2006).

Parmi les 5 nucléobases, l'adénine présente le signal le plus fort tandis que la thymine a le signal le moins intense (Grajcar and Baron 2001). Barhoumi et al. (2008) comparent le signal SERS de l'adénine à ceux de séquences d'ADN thiolés, simple- et double-brin, fixés sur des surfaces d'or: les spectres SERS correspondant sont présentés en **Figure I-18**. L'adénine domine le signal SERS obtenu lors de l'analyse d'ADN simple et double brin.

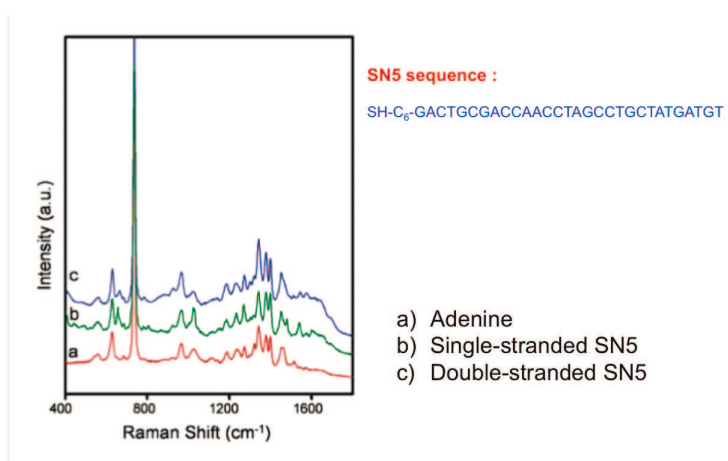


Figure I – 18 : Spectres SERS d'adénine, comparé à ceux d'une séquence simple- et double-brin d'ADN appelée SN5. L'ADN cible est présent en concentration 40 μ M. (d'après Barhoumi et al., 2008).

Prado et al. (2011) rapportent la détection quantitative et reproductible de séquences d'ARN sous forme polynucléotides (poly-A, poly-U, poly-G et poly-U) et montrent qu'il est possible de quantifier les proportions relatives de chaque séquence dans un mélange. Driskell et al. ont détecté par SERS des séquences courtes d'ARN (19-25 nucléotides), et ont montré que le signal dépend de la séquence, car on distingue les signaux des différentes bases la composant (Driskell, Seto et al. 2008; Driskell and Tripp 2010). Les limites de détection par SERS des différents nucléotides sont de 20 pmol pour la guanosine, la cytidine et l'uridine. Pour l'adénine, une limite de détection de 2 pmol est atteinte (Prado et al., 2011).

Des méthodes de détection d'ADN par SERS peuvent impliquer la présence de sondes spécifiques. Green et al. (2006) utilisent par exemple des sondes oligonucléotidiques thiolées fixées sur plaque. La présence d'une séquence d'ADN cible, et donc son hybridation à la sonde, entraîne un changement dans le signal SERS mesuré. Si la séquence introduite n'est pas spécifique de la sonde, elle ne s'hybride pas, et aucun changement SERS n'est observé. Zhang et al. (2011) utilisent une sonde fonctionnalisée portant une particule d'or recouverte de 5,5'-dithiobis(succinimidy-2-nitrobenzoate) (DSNB). Le signal mesuré n'est pas ici le signal SERS intrinsèque de l'ADN mais celui de la DSNB qui joue le rôle de marqueur. Une seconde sonde est fixée à une bille magnétique. Si la séquence cible est présente, elle s'hybride avec ces deux sondes. L'immobilisation des complexes hybridés avec un aimant rapproche les particules d'or, et cette agrégation mécanique entraîne un signal SERS de la molécule DSNB (**Figure I – 19**). La limite de détection de la méthode de Zhang et al. (2011) est de 10 pM.

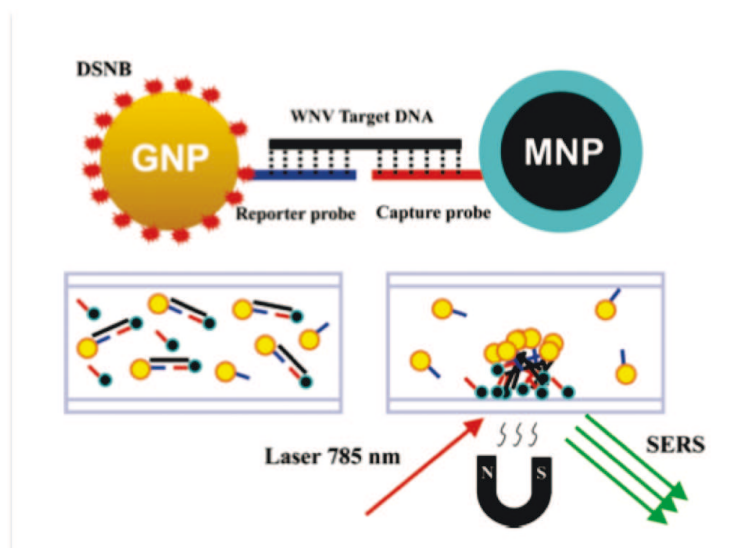


Figure I – 19 : Méthode de détection d'ADN utilisée par Zhang et al. (2011). Les complexes hybridés sont immobilisés par un aimant grâce aux billes magnétiques (MNP). Les billes d'or (GNP), couvertes de DSNB, sont alors agrégées, et le signal SERS de la DSNB est bien visible, indiquant la présence de la séquence cible.

IV.2.2 Détection d'acides nucléiques par SERRS

La molécule d'ADN, bien que détectable en SERS sans être marquée (*e.g.* Bell 2006 ; Prado 2011), n'a pas une adsorption optimale sur les substrats SERS. Elle est en effet chargée négativement, et son adsorption sur les surfaces métalliques également chargées négativement comme les particules d'un colloïde d'argent n'est donc pas optimale (Faulds, Smith et al. 2005). De plus, les molécules d'acides nucléiques n'ont pas de chromophore pouvant profiter de l'effet SERRS de résonance. Afin d'amplifier encore le signal et de détecter de l'ADN à des concentrations inférieures au picomolaire, il est recommandé de travailler avec des séquences d'acides nucléiques marquées. La détection spécifique d'ADN par SERRS est développée depuis une vingtaine d'années, notamment par l'équipe du Pr. Graham (université de Strathclyde, Glasgow, UK) (Vo-Dinh, Houck et al. 1994; Graham, Smith et al. 1997). En marquant l'ADN avec un chromophore actif en SERRS, on peut en abaisser la limite de détection de plusieurs ordres de grandeurs (Faulds, Smith et al. 2005) ce qui a permis de travailler de façon quantitative à des concentrations d'ADN très faibles allant jusqu'au pM

(Graham, Smith et al. 1997; Graham, Mallinder et al. 2000; Graham, Mallinder et al. 2000; Faulds, Barbagallo et al. 2004; Faulds, Graham et al. 2004; Faulds, Smith et al. 2005; Faulds, Stewart et al. 2005; Graham and Faulds 2008). Une telle sensibilité pourrait dispenser à terme de l'étape d'amplification par PCR, critique pour la détection d'ADN dégradé. Dans le cadre de mon travail de thèse, c'est donc à la détection d'ADN marqué par SERRS que je me suis intéressée en collaboration avec M. Merheb, doctorant à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (équipe Paléogénomique et évolution moléculaire).

Une large gamme de marqueurs, fluorescents ou non, peut être utilisée, car les surfaces métalliques trempent la fluorescence (Graham, Smith et al. 1997; Graham, Mallinder et al. 2000; Graham, Faulds et al. 2006). L'équipe de Graham a étudié et comparé en détails plusieurs molécules actives en SERRS, dont la structure est présentée en **Figure I-20** (Graham, Mallinder et al. 2000; Faulds, Graham et al. 2004; Faulds, McKenzie et al. 2007; Faulds, Jarvis et al. 2008).

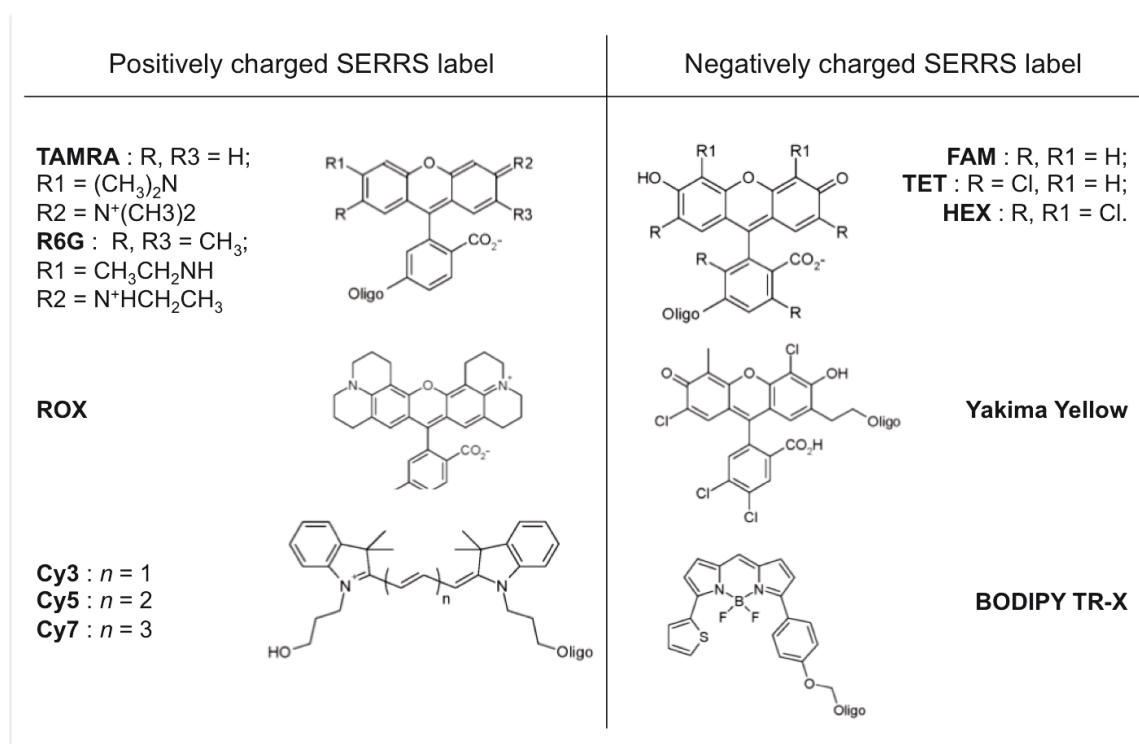


Figure I – 20 : Structures 2D de marqueurs SERRS pour la détection d'ADN. Des marqueurs positivement et négativement chargés peuvent être utilisés (modifié d'après Graham et Faulds 2008).

Les marqueurs SERRS peuvent être positivement ou négativement chargés. Les marqueurs positivement chargés, comme la molécule de Rhodamine 6G, s'adsorbent facilement en surface des particules d'argent chargées négativement (**Figure I - 21**). L'adsorption est moins efficace pour les marqueurs négativement chargés, comme HEX (hexachlorofluoresceine). Graham et al. (1997) proposent d'insérer entre la séquence d'acide nucléiques marquée et le marqueur SERRS négativement chargé des bases modifiées chargées positivement afin d'optimiser l'adsorption de la molécule d'ADN marquée (**Figure I - 21**) (Graham et al., 1997 ; Faulds et al., 2007). Ces bases modifiées ont pour formule 5-aminopropargyl-2'-désoxyuridine.

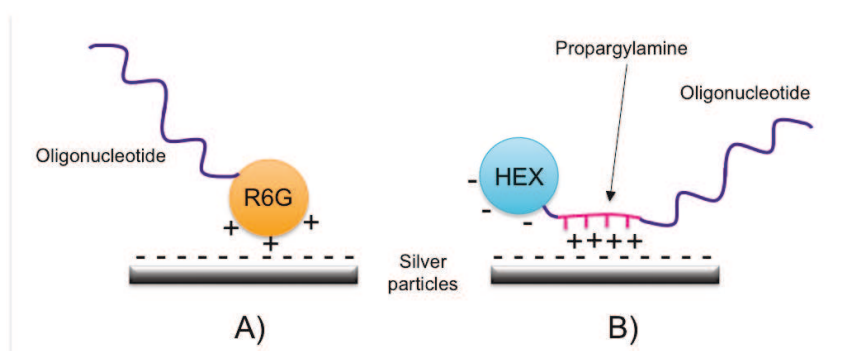


Figure I - 21 : Adsorption d'oligonucléotides marqués en surface de particules d'argent colloïdal. A) La R6G positivement chargée s'adsorbe directement; B) HEX étant négativement chargé, des bases modifiées de type propargylamine, chargées positivement, sont insérées afin de permettre l'adsorption (modifié d'après Faulds et al., 2007).

Chaque marqueur possède un signal SERRS distinct, permettant une identification univoque des séquences d'ADN marqué. A titre d'exemple, les spectres SERRS de 8 marqueurs sont présentés en **Figure I-22**.

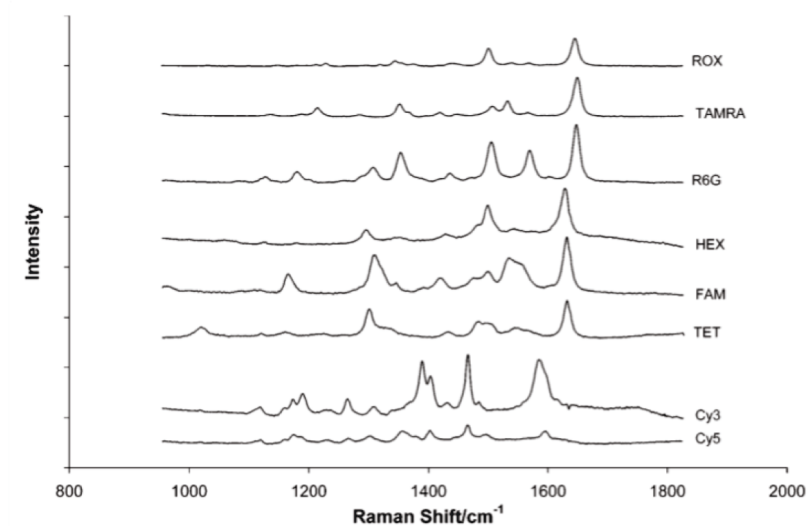


Figure I – 22 : Spectres SERRS de séquences d'ADN marqué en concentration 10^{-8} M par 8 différents marqueurs : ROX, TAMRA, R6G, HEX, FAM, TET, Cy3 et Cy5. Longueur d'onde d'excitation = 514,1 nm (extrait de Faulds et al., 2004).

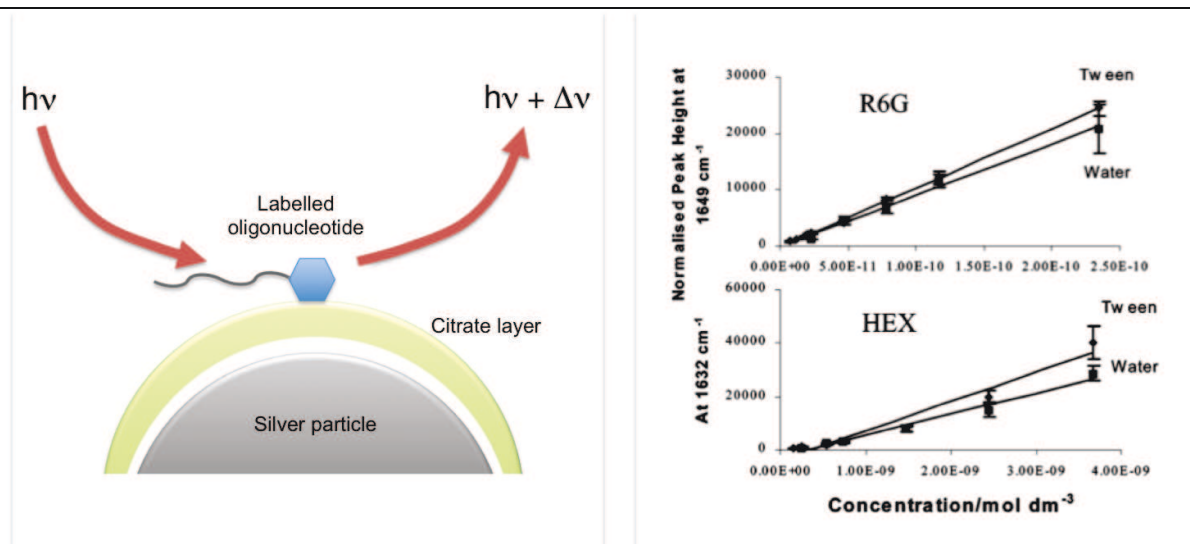
Les limites de détection par SERRS des marqueurs présentés en Figure I – 20 ont été mesurées à différentes longueurs d'onde (514,5 nm, 632,8 nm et 785 nm) sur des surfaces d'argent et d'or, et sont résumées dans le **Tableau I-3**. Les limites de détection sont ici obtenues calculées comme étant la moyenne du blanc, à laquelle sont ajoutées 3 déviations standard divisées par la pente de la courbe de calibration.

Bien que les colloïdes d'argent soient les plus utilisés, les colloïdes d'or donnent également de bons résultats pour certains marqueurs comme Cy5 ou Bodipy-RX (Stokes, Macaskill et al. 2007; Graham and Faulds 2008). Parmi tous les marqueurs SERRS recensés, la Rhodamine 6G (R6G) donne les meilleurs signaux à concentrations faibles, avec une limite de détection par SERRS de l'ordre de 10^{-12} M à la longueur d'onde d'excitation 514,5 nm sur une surface d'argent.

La **Figure I - 23** présente le principe de détection quantitative par SERRS d'une séquence d'ADN ou d'ARN marquée sur les particules d'un colloïde d'argent.

Tableau I-3 : Longueur d'onde d'absorption maximale, et limites de détection SERRS d'une série de marqueurs utilisés dans l'analyse d'ADN marqué. (modifié d'après Graham et Faulds, 2008)

		$\lambda_{\text{ex}} = 514,5 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{ex}} = 632,8 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{ex}} = 785 \text{ nm}$
Marqueur	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}$	Argent (M)	Argent (M)	Or (M)
R6G	524	$1,2 \times 10^{-12}$	$1,1 \times 10^{-10}$	-
TAMRA	565	$3,5 \times 10^{-12}$	$1,8 \times 10^{-10}$	-
ROX	585	$8,1 \times 10^{-11}$	$3,3 \times 10^{-11}$	-
HEX	535	$7,8 \times 10^{-12}$	$1,2 \times 10^{-9}$	-
TET	521	$1,6 \times 10^{-11}$	$2,0 \times 10^{-9}$	-
FAM	492	$2,7 \times 10^{-12}$	$2,0 \times 10^{-9}$	-
BODIPY TR-X	588	$1,3 \times 10^{-10}$	$7,9 \times 10^{-12}$	$4,9 \times 10^{-10}$
Yakima Yellow	526	$1,7 \times 10^{-11}$	-	-
Cy3	552	$2,6 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-10}$	-
Cy5	643	-	$8,3 \times 10^{-11}$	$1,7 \times 10^{-9}$
Cy7	748	-	-	$5,8 \times 10^{-11}$

**Figure I - 23** : a) Principe de détection SERRS d'un oligonucléotide marqué adsorbé en surface des particules d'un colloïde d'argent ; b) Courbes de calibration pour la détection d'oligonucléotides marqués par 1 molécule de Rhodamine 6G et par une molécule de HEX, dans l'eau ou dans le surfactant Tween (d'après Faulds et al., 2004 et Graham et al., 2006)

L'intensité des pics les plus intenses du signal SERRS d'un oligonucléotide marqué est linéairement corrélée à la concentration de l'ADN marqué dans l'échantillon sondé (**Figure I – 23 b**). Cette méthode de détection est donc quantitative (Faulds et al., 2004 ; Graham et al., 2006).

La spectroscopie SERRS offre de multiples avantages pour l'analyse d'ADN marqué. Il est possible de réaliser des détections multiples simultanées car les pics Raman sont fins. Des marqueurs SERRS avec des longueurs d'onde d'absorption maximale proches peuvent être détectés simultanément (**Figure I – 24**) (Graham, Mallinder et al. 2002; Docherty, Smith et al. 2004; Faulds, Jarvis et al. 2008).

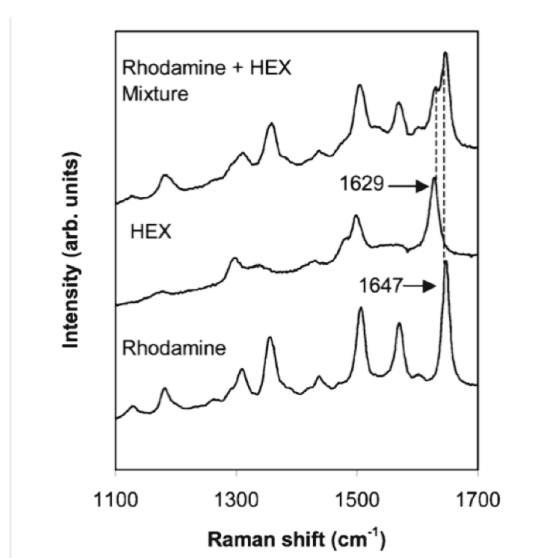


Figure I - 24: Spectres SERRS des marqueurs R6G, HEX ainsi que d'un mélange des 2 (extrait de Docherty et al., 2004).

Stokes et al. (2007) utilisent plusieurs longueurs d'onde d'excitation afin de profiter des résonances de différents marqueurs SERRS. L'utilisation d'un colloïde d'argent pour la détection d'ADN marqué offre également une grande flexibilité quant aux volumes analysés. Il peut être incorporé dans des puces microfluidiques qui ont ainsi été mises au point pour la détection de séquences d'ADN marquées (Docherty et al., 2004).

Certaines équipes fonctionnalisent les particules métalliques des colloïdes d'argent ou d'or afin d'en faire à la fois le substrat SERRS et la sonde de détection (Cao, Jin et al. 2002; Graham, Thompson et al. 2008; Sun and Irudayaraj 2009). Graham et al. (2008) fonctionnalisent des particules d'argent, et utilisent le processus d'agrégation comme révélateur du signal SERRS (**Figure I – 25**). Si la séquence cible est présente, les particules fonctionnalisées se rapprochent en s'hybridant à la séquence cible, et l'agrégation entraîne une hausse du signal SERRS. Sun et al. (2010) utilisent ce même genre de particules d'argent fonctionnalisées pour la détection spécifique d'ADN sur puce.

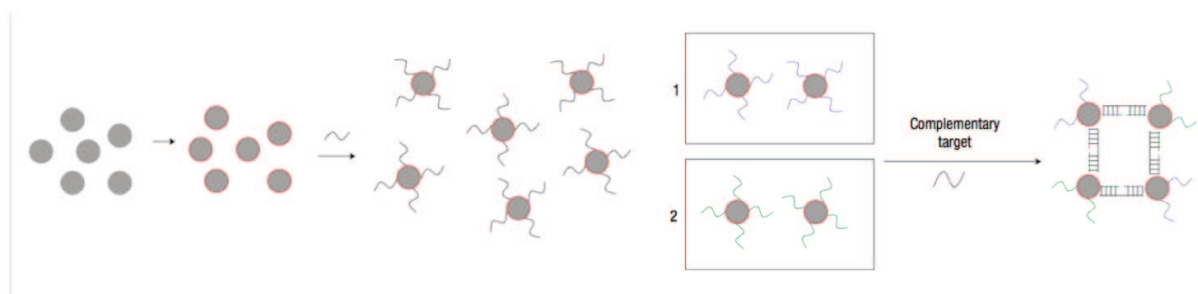


Figure I - 25 : Méthode de détection spécifique d'ADN simple-brin utilisant des particules de colloïde d'argent doublement fonctionnalisées par un marqueur SERRS et un oligonucléotide spécifique. (Graham et al., 2008)

D'autres approches reposent sur le concept de balises SERRS (SERRS Beacon en anglais), qui sont des oligonucléotides marqués formant des boucles d'auto-appariement. La présence d'ADN cible peut être indiquée par une baisse ou une disparition du signal SERRS, liée à l'hybridation de la balise SERRS à la séquence cible, qui éloigne le marqueur SERRS de la surface métallique. Deux exemples sont présentés en **Figure I – 26**.

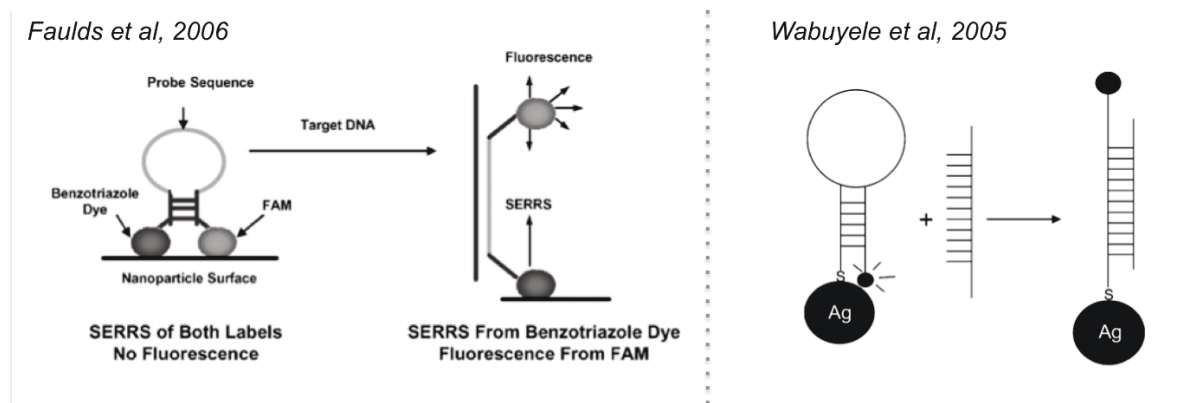


Figure I – 26 : Méthodes de détection d’ADN simple-brin reposant sur l’utilisation de balises SERRS formant une boucle d’auto-appariement. Ces deux méthodes, par Faulds et al. (2006) et Wabuyele et al. (2005) impliquent une baisse ou disparition du signal SERRS en présence de la séquence d’ADN d’intérêt.

Faulds et al. (2006) utilisent un oligonucléotide marqué en une extrémité par une molécule de FAM, et en l’autre extrémité par une molécule de Benzotriazole, molécules fluorescentes. En absence de la séquence cible, les 2 marqueurs sont adsorbés en surface des particules d’argent, et on observe donc leurs signaux SERRS. En présence de la séquence d’ADN cible, celle ci s’hybride avec l’oligonucléotide marqué, éloignant ainsi la balise FAM de la surface métallique. Elle émet donc de la fluorescence, et son signal SERRS disparaît (**Figure I - 26**). Wabuyele et al. (2005) utilisent une approche similaire pour détecter un fragment d’ADN simple-brin du virus du SIDA (VIH). Ils privilégient une attache covalente de la balise SERRS en surface des particules métalliques par liaison thiol. Quand l’ADN cible est présent, il s’hybride à la balise SERRS, causant l’éloignement de la balise SERRS de la surface métallique, et donc une baisse significative du signal SERRS (**Figure I – 26**).

À l’opposé, les balises SERRS peuvent être conçues pour donner lieu à un fort signal SERRS en présence de la séquence cible d’ADN uniquement. Van Lierop et al. (2011) ont développé des balises SE(R)RS dont l’utilisation repose sur le principe qu’une séquence d’ADN double-brin a beaucoup moins d’affinité que l’ADN simple-brin pour les surfaces métalliques chargées négativement (**Figure I- 27**).

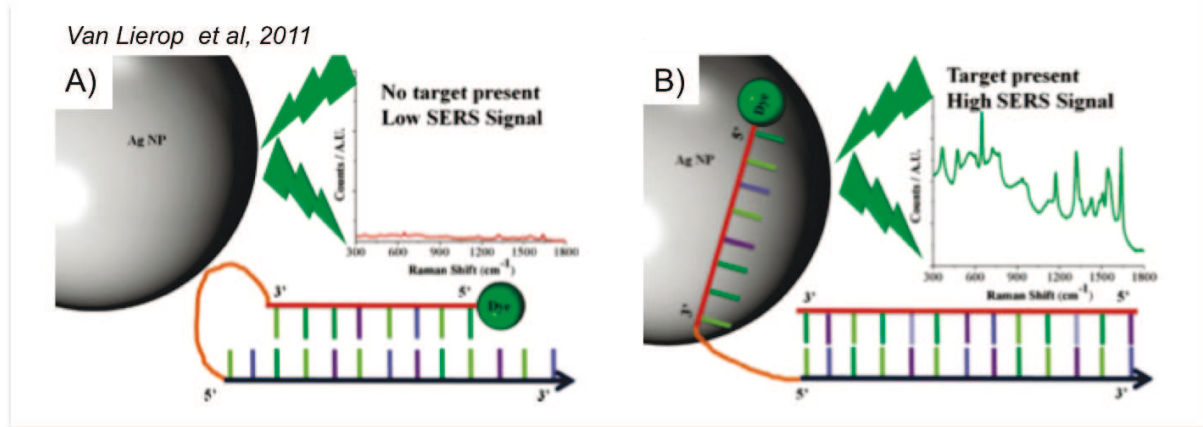


Figure I – 27 : Détection d'ADN simple-brin par SE(R)RS. A) En l'absence d'ADN cible, la balise SE(R)RS s'auto-apparie en boucle et n'est pas adsorbée sur les particules du colloïde d'argent. Le signal SE(R)RS observé est faible à inexistant. B) En présence de la séquence d'ADN cible, la balise s'ouvre ; une partie s'hybride avec la séquence cible. L'autre partie est marquée par un label SE(R)RS et est alors libre de s'adsorber sur les particules d'argent, donnant lieu à un fort signal SE(R)RS (Van Lierop et al., 2011)

Le système est utilisable avec toute la gamme de marqueurs SERRS présentée en **Figure I – 20**. Selon la longueur d'onde d'excitation, on aura ou non effet de résonance.

Si les méthodes présentées jusqu'ici sont très performantes pour la détection d'ADN simple brin, aucune méthode n'a été conçue pour détecter totalement non-enzymatiquement de l'ADN double-brin tel qu'il existe naturellement. En milieu naturel, l'ADN est une molécule double-brin potentiellement dégradée et donc potentiellement indisponible pour les analyses classiques par PCR. L'objectif est donc de développer une méthode non-enzymatique de détection d'ADN double-brin, en utilisant la spectroscopie SERRS.

Références bibliographiques

- Ali, E. M. A., H. G. M. Edwards, et al. (2008). "Raman spectroscopic investigation of cocaine hydrochloride on human nail in a forensic context." Analytical and Bioanalytical Chemistry **390**(4): 1159-1166.
- Anchordoquy, T. J. and M. C. Molina (2007). "Preservation of DNA." Cell Preservation Technology **5**(4): 180-188.
- Austin, J. J., A. B. Smith, et al. (1997). "Palaeontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA." Trends Ecol Evol **12**(8): 303-306.
- Bada, J. L., P. Ehrenfreund, et al. (2008). "Urey: Mars Organic and Oxidant Detector." Space Science Reviews **135**(1-4): 269-279.
- Bada, J. L., X. Y. S. Wang, et al. (1999). "Preservation of key biomolecules in the fossil record: current knowledge and future challenges." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **354**(1379): 77-86.
- Banholzer, M. J., J. E. Millstone, et al. (2008). "Rationally designed nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy." Chemical Society Reviews **37**(5): 885-897.
- Barhoumi, A., D. Zhang, et al. (2008). "Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA." Journal of the American Chemical Society **130**(16): 5523-5529.
- Belak, S. and A. Ballagi-Pordany (1993). "Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology." Vet Res Commun **17**(1): 55-72.
- Bell, S. E. and N. M. Sirimuthu (2006). "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for sub-micromolar detection of DNA/RNA mononucleotides." Journal of the American Chemical Society **128**(49): 15580-15581.
- Besetti, J. (2007). "An Introduction to PCR Inhibitors." Profiles in DNA (promega.com).
- Boyce, C. K., G. D. Cody, et al. (2002). "Organic chemical differentiation within fossil plant cell walls detected with X-ray spectromicroscopy." Geology **30**(11): 1039-1042.
- Brassell, S. C., R. G. Brereton, et al. (1986). "Paleoclimatic Signals Recognized by Chemometric Treatment of Molecular Stratigraphic Data." Organic Geochemistry **10**(4-6): 649-660.
- Briggs, A. W., U. Stenzel, et al. (2007). "Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(37): 14616-14621.
- Briggs, A. W., U. Stenzel, et al. (2010). "Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA." Nucleic Acids Research **38**(6).
- Brocks, J. J. (2011). "Millimeter-scale concentration gradients of hydrocarbons in Archean shales: Live-oil escape or fingerprint of contamination?" Geochimica Et Cosmochimica Acta **75**(11): 3196-3213.
- Brocks, J. J. and J. Banfield (2009). "Unravelling ancient microbial history with community proteogenomics and lipid geochemistry." Nat Rev Microbiol **7**(8): 601-609.
- Brocks, J. J., R. Buick, et al. (2003). "A reconstruction of Archean biological diversity based on molecular fossils from the 2.78 to 2.45 billion-year-old Mount Bruce Supergroup, Hamersley Basin, Western Australia." Geochimica Et Cosmochimica Acta **67**(22): 4321-4335.
- Brocks, J. J., G. A. Logan, et al. (1999). "Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes." Science **285**(5430): 1033-1036.
- Brocks, J. J., G. D. Love, et al. (2005). "Biomarker evidence for green and purple sulphur bacteria in a stratified Palaeoproterozoic sea." Nature **437**(7060): 866-870.
- Brotherton, P., Endicott, P., Sanchez, J.J., Beaumont, M., Barnett, R., Austin, J., Cooper, A. (2007). "Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C'U-type

- base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions." Nucleic acids research **35**(17): 5717–5728.
- Brown, T., Brown, K. (2011). Biomolecular archeology : an introduction.
- Calvignac, S., J. M. Terme, et al. (2008). "Ancient DNA identification of early 20th century simian T-cell leukemia virus type 1." Mol Biol Evol **25**(6): 1093-1098.
- Cao, Y. W. C., R. C. Jin, et al. (2002). "Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection." Science **297**(5586): 1536-1540.
- Cavalli-Sforza, L. L. and M. W. Feldman (2003). "The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution." Nat Genet **33 Suppl**: 266-275.
- Cheng, K. C., Cahill, D., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L.A. (1992). "8-hydroxyguanine, an Abundant Form of Oxidative DNA Damage, Causes G / T and A / C Substitutions." Journal of Biological Chemistry **267**(1): 166-172.
- Chourpa, I., F. H. Lei, et al. (2008). "Intracellular applications of analytical SERS spectroscopy and multispectral imaging." Chemical Society Reviews **37**(5): 993-1000.
- Cialla, D., A. Marz, et al. (2012). "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends." Anal Bioanal Chem **403**(1): 27-54.
- Cooper, A. and H. N. Poinar (2000). "Ancient DNA: Do it right or not at ALL." Science **289**(5482): 1139-1139.
- Creighton, J. A., C. G. Blatchford, et al. (1979). "Plasma Resonance Enhancement of Raman-Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength." Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II **75**: 790-798.
- d'Abbadie, M., P. Holliger, et al. (2007). "Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA." Nature Biotechnology **25**(8): 939-943.
- Dallongeville, S., M. Koperska, et al. (2011). "Identification of Animal Glue Species in Artworks Using Proteomics: Application to a 18th Century Gilt Sample." Analytical Chemistry **83**(24): 9431-9437.
- Di Bernardo, G., S. Del Gaudio, et al. (2002). "Enzymatic repair of selected cross-linked homoduplex molecules enhances nuclear gene rescue from Pompeii and Herculaneum remains." Nucleic acids research **30**(4).
- Docherty, F. T., W. E. Smith, et al. (2004). "The first SERRS multiplexing from labelled oligonucleotides in a microfluidics lab-on-a-chip." Chemical Communications(1): 118-119.
- Donoghue, H. D., M. Spigelman, et al. (2004). "Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA." Lancet Infect Dis **4**(9): 584-592.
- Driskell, J. D., A. G. Seto, et al. (2008). "Rapid microRNA (miRNA) detection and classification via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)." Biosensors & Bioelectronics **24**(4): 917-922.
- Driskell, J. D. and R. A. Tripp (2010). "Label-free SERS detection of microRNA based on affinity for an unmodified silver nanorod array substrate." Chemical Communications **46**(19): 3298-3300.
- Eigenbrode, J. L. (2008). "Fossil lipids for life-detection: A case study from the early earth record." Space Science Reviews **135**(1-4): 161-185.
- Fan, M. K., G. F. S. Andrade, et al. (2011). "A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry." Analytica Chimica Acta **693**(1-2): 7-25.
- Faulds, K., R. P. Barbagallo, et al. (2004). "SERRS as a more sensitive technique for the detection of labelled oligonucleotides compared to fluorescence." Analyst **129**(7): 567-568.

- Faulds, K., L. Fruk, et al. (2006). "A new approach for DNA detection by SERRS." Faraday Discussions **132**: 261-268.
- Faulds, K., D. Graham, et al. (2004). "Evaluation of surface-enhanced resonance Raman scattering for quantitative DNA analysis." Analytical Chemistry **76**(2): 412-417.
- Faulds, K., R. Jarvis, et al. (2008). "Multiplexed detection of six labelled oligonucleotides using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS)." Analyst **133**(11): 1505-1512.
- Faulds, K., R. E. Littleford, et al. (2004). "Comparison of surface-enhanced resonance Raman scattering from unaggregated and aggregated nanoparticles." Analytical Chemistry **76**(3): 592-598.
- Faulds, K., F. McKenzie, et al. (2007). "Quantitative simultaneous multianalyte detection of DNA by dual-wavelength surface-enhanced resonance Raman scattering." Angewandte Chemie-International Edition **46**(11): 1829-1831.
- Faulds, K., W. E. Smith, et al. (2005). "DNA detection by surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS)." Analyst **130**(8): 1125-1131.
- Faulds, K., L. Stewart, et al. (2005). "Quantitative detection of dye labelled DNA using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS) from silver nanoparticles." Talanta **67**(3): 667-671.
- Fernandez, H., S. Hughes, et al. (2006). "Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from the initial domestication areas." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15375-15379.
- Fischer, W. W. (2008). "Biogeochemistry - Life before the rise of oxygen." Nature **455**(7216): 1051-1052.
- Fleischm.M, P. J. Hendra, et al. (1974). "Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode." Chemical Physics Letters **26**(2): 163-166.
- Gilbert, M. T. P., A. Cooper, et al. (2003). "Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA." American Journal of Human Genetics **72**(1): 32-47.
- Ginolhac, A., M. Rasmussen, et al. (2011). "mapDamage: testing for damage patterns in ancient DNA sequences." Bioinformatics **27**(15): 2153-2155.
- Gloeckner, C., K. B. M. Sauter, et al. (2007). "Evolving a thermostable DNA polymerase that amplifies from highly damaged templates." Angewandte Chemie-International Edition **46**(17): 3115-3117.
- Golenberg, E. M., A. Bickel, et al. (1996). "Effect of highly fragmented DNA on PCR." Nucleic acids research **24**(24): 5026-5033.
- Graham, D. and K. Faulds (2008). "Quantitative SERRS for DNA sequence analysis." Chemical Society Reviews **37**(5): 1042-1051.
- Graham, D., K. Faulds, et al. (2006). "Biosensing using silver nanoparticles and surface enhanced resonance Raman scattering." Chemical Communications(42): 4363-4371.
- Graham, D., B. J. Mallinder, et al. (2000). "Detection and identification of labeled DNA by surface enhanced resonance Raman scattering." Biopolymers **57**(2): 85-91.
- Graham, D., B. J. Mallinder, et al. (2000). "Surface-enhanced resonance Raman scattering as a novel method of DNA discrimination." Angewandte Chemie-International Edition **39**(6): 1061-+.
- Graham, D., B. J. Mallinder, et al. (2002). "Simple multiplex genotyping by surface-enhanced resonance Raman scattering." Analytical Chemistry **74**(5): 1069-+.
- Graham, D., W. E. Smith, et al. (1997). "Selective detection of deoxyribonucleic acid at ultralow concentrations by SERRS." Analytical Chemistry **69**(22): 4703-4707.
- Graham, D., D. G. Thompson, et al. (2008). "Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles." Nature Nanotechnology **3**(9): 548-551.

- Grajcar, L. and M. H. Baron (2001). "A SERS probe of adenyl residues available for intermolecular interactions. Part I - adenyl 'fingerprint'." Journal of Raman Spectroscopy **32**(11): 912-918.
- Green, M., F. M. Liu, et al. (2006). "SERS platforms for high density DNA arrays." Faraday Discussions **132**: 269-280.
- Green, R. E., J. Krause, et al. (2010). "A Draft Sequence of the Neandertal Genome." Science **328**(5979): 710-722.
- Griffith, W. P. (1969). "Raman Spectroscopy of Minerals." Nature **224**(5216): 264-&.
- Gupta, N. S., D. E. G. Briggs, et al. (2007). "Molecular preservation of plant and insect cuticles from the Oligocene Enspel Formation, Germany: Evidence against derivation of aliphatic polymer from sediment." Organic Geochemistry **38**(3): 404-418.
- Gupta, P. K. (2008). "Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research." Trends Biotechnol **26**(11): 602-611.
- Halvorson, R. A. and P. J. Vikesland (2010). "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Environmental Analyses." Environmental Science & Technology **44**(20): 7749-7755.
- Hansen, A. J., D. L. Mitchell, et al. (2006). "Crosslinks rather than strand breaks determine access to ancient DNA sequences from frozen sediments." Genetics **173**(2): 1175-1179.
- Haracska, L., M. T. Washington, et al. (2001). "Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase eta." Journal of Biological Chemistry **276**(9): 6861-6866.
- Haring, M., H. Rudiger, et al. (1994). "Recognition of Oxidized Abasic Sites by Repair Endonucleases." Nucleic Acids Research **22**(11): 2010-2015.
- Haynes, C. L. and R. P. Van Duyne (2001). "Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics." Journal of Physical Chemistry B **105**(24): 5599-5611.
- Hebsgaard, M. B., M. J. Phillips, et al. (2005). "Geologically ancient DNA: fact or artefact?" Trends in Microbiology **13**(5): 212-220.
- Hebting, Y., P. Schaeffer, et al. (2006). "Biomarker evidence for a major preservation pathway of sedimentary organic carbon." Science **312**(5780): 1627-1631.
- Heyn, P., U. Stenzel, et al. (2010). "Road blocks on paleogenomes-polymerase extension profiling reveals the frequency of blocking lesions in ancient DNA." Nucleic Acids Research **38**(16).
- Higuchi, R., B. Bowman, et al. (1984). "DNA-Sequences from the Quagga, an Extinct Member of the Horse Family." Nature **312**(5991): 282-284.
- Hofreiter, M., S. Paabo, et al. (2001). "Ancient DNA." Nature Reviews Genetics **2**(5): 353-359.
- Hoss, M., P. Jaruga, et al. (1996). "DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues." Nucleic Acids Research **24**(7): 1304-1307.
- Howes, B. D., S. Scatragli, et al. (2006). "Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of rifamycins on silver nanoparticles: insight into their adsorption mechanisms." Journal of Raman Spectroscopy **37**(9): 900-909.
- Kemp, B. M., C. Monroe, et al. (2006). "Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts." Journal of Archaeological Science **33**(12): 1680-1689.
- Kminek, G. and J. L. Bada (2006). "The effect of ionizing radiation on the preservation of amino acids on Mars." Earth and Planetary Science Letters **245**(1-2): 1-5.
- Kneipp, J., H. Kneipp, et al. (2008). "SERS--a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics." Chemical Society Reviews **37**(5): 1052-1060.

- Kneipp, K., H. Kneipp, et al. (1999). "Surface-enhanced Raman scattering: A new tool for biomedical spectroscopy." Current Science **77**(7): 915-924.
- Kreader, C. A. (1996). "Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein." Appl. Environ. Microbiol. **62**(3): 1102.
- Krings, M., C. Capelli, et al. (2000). "A view of Neandertal genetic diversity." Nat Genet **26**(2): 144-146.
- Kuypers, M. M. M., P. Blokker, et al. (2001). "Massive expansion of marine archaea during a mid-Cretaceous oceanic anoxic event." Science **293**(5527): 92-94.
- Lalueza-Fox, C., M. L. Sampietro, et al. (2004). "Unravelling migrations in the steppe: mitochondrial DNA sequences from ancient central Asians." Proc Biol Sci **271**(1542): 941-947.
- Lee, P. C. and D. Meisel (1982). "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols." Journal of Physical Chemistry **86**(17): 3391-3395.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and Decay of the Primary Structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.
- Lindahl, T. and B. Nyberg (1972). "Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid." Biochemistry **11**(19): 3610-&.
- Littleford, R. E., G. Dent, et al. (2004). "A comparison of electrochemical and colloidal surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS) from two analytes designed to chemisorb to silver surfaces." Vibrational Spectroscopy **35**(1-2): 51-57.
- Maher, R. C., P. Etchegoin, et al. (2002). "Single molecule photo-bleaching observed by surface enhanced resonant Raman scattering (SERRS)." Chemical Physics Letters **352**(5-6): 378-384.
- Mardis, E. R. (2008). "Next-generation DNA sequencing methods." Annual review of genomics and human genetics **9**: 387-402.
- McDonald, J. P., A. Hall, et al. (2006). "Novel thermostable Y-family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs." Nucleic acids research **34**(4): 1102-1111.
- Mitchell, D., E. Willerslev, et al. (2005). "Damage and repair of ancient DNA." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **571**(1-2): 265-276.
- Molak, M. and S. Y. W. Ho (2011). "Evaluating the Impact of Post-Mortem Damage in Ancient DNA: A Theoretical Approach." Journal of Molecular Evolution **73**(3-4): 244-255.
- Moskovits, M. (1985). "Surface-Enhanced Spectroscopy." Reviews of Modern Physics **57**(3): 783-826.
- Moskovits, M. (2005). "Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective." Journal of Raman Spectroscopy **36**(6-7): 485-496.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology **51 Pt 1**: 263-273.
- Nie, S. M. and S. R. Emery (1997). "Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering." Science **275**(5303): 1102-1106.
- Orlando, L., P. Darlu, et al. (2006). "Revisiting Neandertal diversity with a 100,000 year old mtDNA sequence." Curr Biol **16**(11): R400-402.
- Orlando, L., A. Ginolhac, et al. (2011). "True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone." Genome Res **21**(10): 1705-1719.
- Orlando, L., Hänni C. (2000). "Du nouveau pour l'ADN ancien." Société française de génétique **16**(n° 8-9).

- Otto, A. (2005). "The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering." *Journal of Raman Spectroscopy* **36**(6-7): 497-509.
- Paabo, S. (1985). "Molecular-Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA." *Nature* **314**(6012): 644-645.
- Paabo, S. (1989). "Ancient DNA - Extraction, Characterization, Molecular-Cloning, and Enzymatic Amplification." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(6): 1939-1943.
- Paabo, S., D. M. Irwin, et al. (1990). "DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification." *Journal of Biological Chemistry* **265**(8): 4718-4721.
- Paabo, S., H. Poinar, et al. (2004). "Genetic analyses from ancient DNA." *Annual Review of Genetics* **38**: 645-679.
- Palmieri, M., M. Vagnini, et al. (2011). "Development of an analytical protocol for a fast, sensitive and specific protein recognition in paintings by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**(9): 3011-3023.
- Pettersson, E., J. Lundeberg, et al. (2009). "Generations of sequencing technologies." *Genomics* **93**(2): 105-111.
- Picard, A., I. Daniel, et al. (2007). "In situ monitoring by quantitative Raman spectroscopy of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure." *Extremophiles* **11**(3): 445-452.
- Poinar, H. N., M. Hofreiter, et al. (1998). "Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*." *Science* **281**(5375): 402-406.
- Poinar, H. N., M. Hoss, et al. (1996). "Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA." *Science* **272**(5263): 864-866.
- Poinar, H. N., C. Schwarz, et al. (2006). "Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA." *Science* **311**(5759): 392-394.
- Poinar, H. N. and B. A. Stankiewicz (1999). "Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(15): 8426-8431.
- Prado, E., N. Daugey, et al. (2011). "Quantitative label-free RNA detection using surface-enhanced Raman spectroscopy." *Chemical Communications* **47**(26): 7425-7427.
- Pusch, C. M., I. Giddings, et al. (1998). "Repair of degraded duplex DNA from prehistoric samples using *Escherichia coli* DNA polymerase I and T4 DNA ligase." *Nucleic acids research* **26**(3): 857-859.
- Radstrom, P., R. Knutsson, et al. (2004). "Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples." *Mol Biotechnol* **26**(2): 133-146.
- Raman, C. V. and K. S. Krishnan (1928). "A new type of secondary radiation." *Nature* **121**: 501-502.
- Rasmussen, B., I. R. Fletcher, et al. (2008). "Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria." *Nature* **455**(7216): 1101-U1109.
- Rasmussen, M., Y. R. Li, et al. (2010). "Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo." *Nature* **463**(7282): 757-762.
- Redrejo-Rodriguez, M., C. Saint-Pierre, et al. (2011). "New Insights in the Removal of the Hydantoins, Oxidation Product of Pyrimidines, via the Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways." *PLoS One* **6**(7).
- Ribechini, E., F. Modugno, et al. (2011). "Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials." *Anal Bioanal Chem* **401**(6): 1727-1738.
- Rycenga, M., C. M. Cobley, et al. (2011). "Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications." *Chemical Reviews* **111**(6): 3669-3712.

- Sabatte, G., R. Keir, et al. (2008). "Comparison of surface-enhanced resonance Raman scattering and fluorescence for detection of a labeled antibody." Analytical Chemistry **80**(7): 2351-2356.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.
- Schaaper, R. M., T. A. Kunkel, et al. (1983). "Infidelity of DNA-Synthesis Associated with Bypass of Apurinic Sites." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences **80**(2): 487-491.
- Schouten, S., E. C. Hopmans, et al. (2000). "Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(26): 14421-14426.
- Schouten, S., E. C. Hopmans, et al. (2002). "Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperatures?" Earth and Planetary Science Letters **204**(1-2): 265-274.
- Shanmukh, S., L. Jones, et al. (2006). "Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate." Nano Letters **6**(11): 2630-2636.
- Shapiro, B. (2008). "Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA." Trends Biotechnol **26**(6): 285-287.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1997). "Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site - A mechanistic study of the "A rule"." Journal of Biological Chemistry **272**(21): 13916-13922.
- Sikorsky, J. A., D. A. Primerano, et al. (2004). "Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method." Biochemical and Biophysical Research Communications **323**(3): 823-830.
- Sikorsky, J. A., D. A. Primerano, et al. (2007). "DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency." Biochemical and Biophysical Research Communications **355**(2): 431-437.
- Smith C.I., C. A. T., Riley M.S., Cooper A., Stringer C.B., Collins M.J. (2001). "Not just old but old and cold." Nature **410**: 771-772.
- Smith, C. J. and A. M. Osborn (2009). "Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology." FEMS Microbiol Ecol **67**(1): 6-20.
- Smith-Palmer, T., C. Douglas, et al. (2010). "Rationalizing the SER spectra of bacteria." Vibrational Spectroscopy **53**(1): 103-106.
- Solazzo, C., W. W. Fitzhugh, et al. (2008). "Identification of protein remains in archaeological potsherds by proteomics." Anal Chem **80**(12): 4590-4597.
- Stankiewicz, B. A., D. E. G. Briggs, et al. (1997). "Chemical preservation of insect cuticle from the Pleistocene asphalt deposits of California, USA." Geochimica Et Cosmochimica Acta **61**(11): 2247-2252.
- Stiles, P. L., J. A. Dieringer, et al. (2008). "Surface-enhanced Raman spectroscopy." Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) **1**: 601-626.
- Stiles, P. L., J. A. Dieringer, et al. (2008). "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy." Annual Review of Analytical Chemistry **1**: 601-626.
- Stokes, D. L. and T. Vo-Dinh (2000). "Development of an integrated single-fiber SERS sensor." Sensors and Actuators B-Chemical **69**(1-2): 28-36.
- Stokes, R. J., A. Macaskill, et al. (2007). "Quantitative enhanced Raman scattering of labeled DNA from gold and silver nanoparticles." Small **3**(9): 1593-1601.

- Strelau, K. K., R. Kretschmer, et al. (2010). "SERS as tool for the analysis of DNA-chips in a microfluidic platform." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(4): 1381-1384.
- Summons, R. E., P. Albrecht, et al. (2008). "Molecular biosignatures." *Space Science Reviews* **135**(1-4): 133-159.
- Summons, R. E., L. L. Jahnke, et al. (1994). "Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria: relevance for interpretation of the geochemical record of biomarkers." *Geochim Cosmochim Acta* **58**(13): 2853-2863.
- Sun, L. and J. Irudayaraj (2009). "PCR-Free Quantification of Multiple Splice Variants in a Cancer Gene by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy." *Journal of Physical Chemistry B* **113**(42): 14021-14025.
- Sun, S. Q., D. Thompson, et al. (2010). "Micro-/nano-patterning of DNA and rapid readout with SERS tags." *Chemical Communications* **46**(29): 5292-5294.
- Teletchea, F., C. Maudet, et al. (2005). "Food and forensic molecular identification: update and challenges." *Trends in Biotechnology* **23**(7): 359-366.
- van Lierop, D., K. Faulds, et al. (2011). "Separation Free DNA Detection Using Surface Enhanced Raman Scattering." *Analytical Chemistry* **83**(15): 5817-5821.
- Vankeirsbilck, T., A. Vercauteren, et al. (2002). "Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **21**(12): 869-877.
- Vasan, S., X. Zhang, et al. (1996). "An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo." *Nature* **382**(6588): 275-278.
- Vo-Dinh, T., K. Houck, et al. (1994). "Surface-enhanced Raman gene probes." *Analytical Chemistry* **66**(20): 3379-3383.
- Vo-Dinh, T., D. L. Stokes, et al. (1999). "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis." *Journal of Raman Spectroscopy* **30**(9): 785-793.
- Wabuyele, M. B. and T. Vo-Dinh (2005). "Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA sequence using plasmonics nanoprobe." *Analytical Chemistry* **77**(23): 7810-7815.
- Wang, S., D. F. P. Pile, et al. (2007). "Nanopin plasmonic resonator array and its optical properties." *Nano Letters* **7**(4): 1076-1080.
- Werne, J. P., T. W. Lyons, et al. (2008). "Investigating pathways of diagenetic organic matter sulfurization using compound-specific sulfur isotope analysis." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **72**(14): 3489-3502.
- Willerslev, E., E. Cappellini, et al. (2007). "Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland." *Science* **317**(5834): 111-114.
- Willerslev, E. and A. Cooper (2005). "Ancient DNA." *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**(1558): 3-16.
- Willerslev, E., A. J. Hansen, et al. (2003). "Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments." *Science* **300**(5620): 791-795.
- Willerslev, E., A. J. Hansen, et al. (2004). "Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost." *Trends Ecol Evol* **19**(3): 141-147.
- Wilson, I. G. (1997). "Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(10): 3741-3751.
- Woodward, S. R., N. J. Weyand, et al. (1994). "DNA-Sequence from Cretaceous Period Bone Fragments." *Science* **266**(5188): 1229-1232.
- Zhang, H., M. H. Harpster, et al. (2011). "Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of DNA Derived from the West Nile Virus Genome Using Magnetic Capture of Raman-Active Gold Nanoparticles." *Analytical Chemistry* **83**(1): 254-260.

-
- Zhang, Q. A., W. Y. Li, et al. (2010). "Seed-Mediated Synthesis of Ag Nanocubes with Controllable Edge Lengths in the Range of 30-200 nm and Comparison of Their Optical Properties." Journal of the American Chemical Society **132**(32): 11372-11378.
- Zischler, H., M. Hoss, et al. (1995). "Detecting Dinosaur DNA." Science **268**(5214): 1192-1193.

Chapitre 2

Détection d'ADN marqué par SERRS, méthodologie

Les travaux présentés dans les chapitres 2 à 5 ont été réalisés en étroite collaboration avec **Maxime Mohamed Merheb**, doctorant dans l'équipe Paléogénétique et évolution moléculaire, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon. MM. Merheb a soutenu sa thèse en décembre 2010.

La détection d'ADN marqué par spectroscopie SERRS nécessite :

- un substrat SERS adapté,
- un agent agrégateur permettant l'amplification du signal,
- un marqueur SERRS dont la longueur d'onde maximale d'absorption est proche de la longueur d'onde d'excitation envisagée

I. Matériel

I.1. Substrat SERS

Le substrat SERRS choisi pour nos mesures est un colloïde d'argent. C'est le substrat SERS le plus utilisé pour la détection d'ADN marqué, et il a, de plus, fourni les meilleures amplifications (Vo-Dinh, Stokes et al. 1999; Littleford, Dent et al. 2004; Strelau, Kretschmer et al. 2010). Les colloïdes d'argent sont facilement préparés en routine pour un faible coût.

Le colloïde d'argent est synthétisé par réduction de nitrate d'argent par du citrate de sodium, selon le protocole de Lee et Meisel (1982) modifié par Graham et al. (1997). Les particules de citrate d'argent ainsi obtenues sont chargées négativement.

Du nitrate d'argent (90 mg ; 99,999 %, Sigma®) est dissout dans 500 ml d'eau distillée à 45°C, sous agitation constante. Une fois le mélange porté à ébullition, 10 ml d'une solution

de citrate de sodium 1% (trisodium citrate, Fischer®) sont ajoutés. La solution est ensuite maintenue à ébullition pendant 90 minutes. On prend soin de couvrir le bécher d'un couvercle en aluminium afin de limiter l'évaporation. La couleur de la solution évolue au cours de la synthèse, passant d'incolore à marron clair. Après 90 minutes d'ébullition, la solution colloïdale a atteint sa couleur finale, jaune-gris. Le colloïde d'argent doit impérativement être conservé à l'abri de la lumière, et peut être utilisé pendant environ 6 mois sans dégradation. Malgré un respect strict du protocole de synthèse, des synthèses distinctes peuvent mener à des colloïdes d'efficacités légèrement différentes. On prendra donc soin d'utiliser le même colloïde pour une même série d'expériences. Les résultats donnés par 2 colloïdes provenant de 2 synthèses différentes peuvent être comparés en utilisant un standard externe commun.

I.2. Agent agrégateur

Il est prouvé que le signal SERRS obtenu avec un colloïde d'argent est 6 fois plus intense si les particules colloïdales sont agrégées en "clusters" (Faulds, Littleford et al. 2004). Plusieurs sels sont couramment utilisés afin d'initier ce regroupement (NaCl, Na₂SO₄, perchlorate de Sodium, Igor Chourpa, formation Teck'co Raman) en perturbant la couche de solvation des particules, modifiant ainsi leur charge de surface (Munro, Smith et al. 1995).

Pour étudier l'ADN marqué par SERRS, l'utilisation de sels n'est cependant pas totalement appropriée. L'utilisation de sels entraîne certes une agrégation des particules du colloïde, mais ne compense pas les charges négatives du squelette de l'ADN. Ces dernières tendraient donc à éloigner les molécules d'ADN marqué de la surface des particules d'argent par répulsion électrostatique. On utilise plutôt la spermine comme agent agrégateur (**Figure II-1**). Cette polyamine organique induit d'une part une agrégation des particules du colloïde et compense d'autre part les charges négatives portées par les groupes phosphates des molécules d'ADN en s'arrimant au squelette phosphaté de la molécule (Feuerstein, Pattabiraman et al. 1990; Faulds, Littleford et al. 2004).

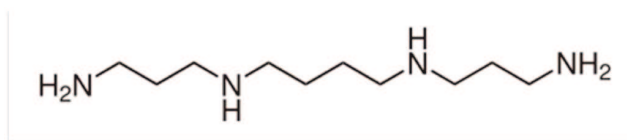


Figure II-1 : Structure 2D de la molécule de Spermine

Les répulsions entre la surface des particules de colloïde chargées négativement et la molécule d'ADN sont ainsi limitées, optimisant l'adsorption de la molécule d'ADN marqué (Graham, Smith et al. 1997; Graham, Mallinder et al. 2000; Graham, Mallinder et al. 2000; Faulds, Stewart et al. 2005; Stokes, Macaskill et al. 2007). L'adsorption de l'ADN marqué est donc plus efficace. Plus la concentration en spermine est forte, plus le signal SERRS obtenu pour l'ADN marqué est fort (Faulds, Littleford et al. 2004).

Des spectres des différents composants nécessaires à l'obtention du signal SERRS ont été acquis afin de pouvoir reconnaître leurs contributions dans les spectres obtenus lors de la détection d'ADN marqué. Ils sont présentés en **Figure II-2**. En particulier, la spermine en forte concentration présente 2 bandes assez larges, centrées à 1400 et 1600 cm^{-1} .

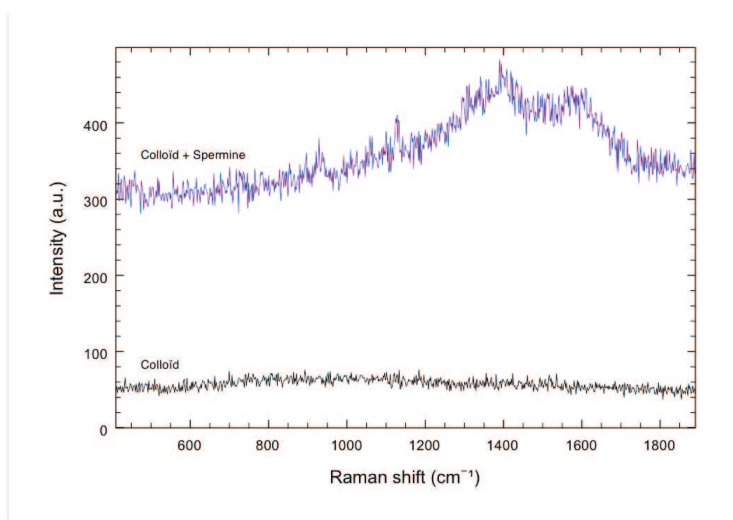


Figure II-2 : Spectres Raman de référence du colloïde d'argent seul et de la spermine en concentration 10^{-2} M. Durée d'acquisition = 1x20 sec.

I.3. Marqueur SERRS

Comme nous l'avons vu en introduction, la molécule d'ADN seule ne possède pas les caractéristiques nécessaires à l'obtention d'une amplification maximale de son signal Raman par SERRS. En effet, si elle présente un signal Raman et un signal SERS, elle n'entrera pas en résonance, ce qui limite le facteur d'amplification. De plus, la molécule d'ADN seule est chargée négativement au niveau de son squelette phosphaté et n'a pas une adsorption optimale en surface des particules d'argent également chargées négativement. Nous allons donc étudier une séquence d'ADN marquée par une molécule résonante présentant un fort signal SERRS. Parmi les 8 molécules testées par Graham et al. (Graham, Mallinder et al. 2000; Faulds, Graham et al. 2004; Faulds, McKenzie et al. 2007; Faulds, Jarvis et al. 2008), la Rhodamine 6G (R6G) donne les meilleurs signaux à concentrations faibles avec une limite de détection par SERRS de l'ordre de 10^{-12} M. Ce marqueur SERRS positivement chargé s'adsorbe facilement en surface des particules de citrate d'argent chargées négativement. Sa longueur d'onde d'absorption maximale est de 524 nm. La R6G permet donc de travailler en SERRS avec une longueur d'onde d'excitation de 514,5 nm, dont nous disposons au LGL.

Nous avons donc étudié un oligonucléotide de 18 bases d'ADN mitochondrial (gène de l'ARNr 12S) de *Rupicapra rupicapra* (Chamois). Cette séquence a été marquée par 3 molécules de R6G. Les molécules de R6G sont liées à l'oligonucléotide par un espaceur, composé d'une molécule d'hexa-éthylène-glycol (HEG) associée à une thymine modifiée appelée Amino-hexyl désoxyribo-thymine. Cette sonde, nommée Rup(R6G)_3 , a été synthétisée par ATD Bio (<http://www.atdbio.com>) et sa structure 2D est présentée en

Figure II-3.

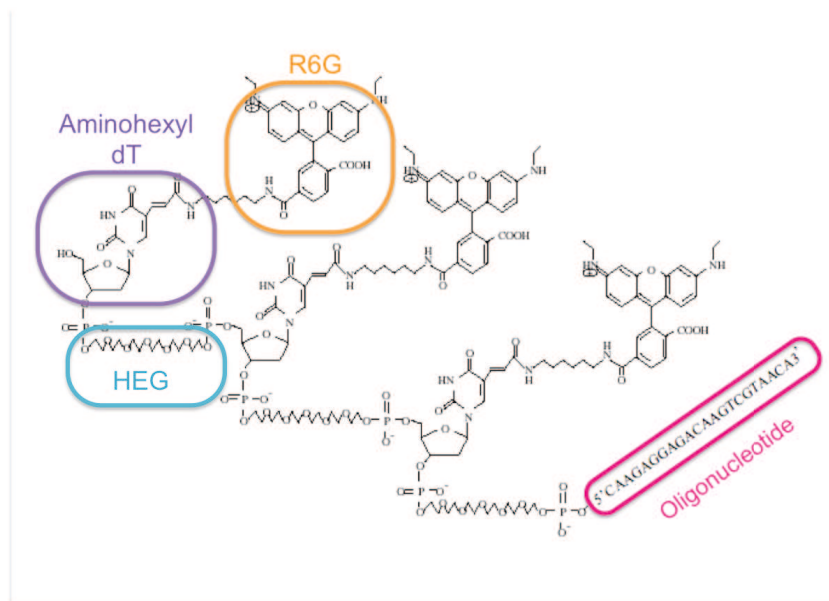


Figure II-3 : Structure 2D la sonde Rup(R6G)₃. L'oligonucléotide de 18 bases est marqué par 3 molécules de Rhodamine 6G (R6G). Chaque molécule de R6G est pourvu d'un espaceur composé d'une molécule d'hexa-éthylène-glycol (HEG) associée à une thymine modifiée appelée Amino-hexyl dT.

Afin d'évaluer l'influence de la séquence d'ADN sur le signal SERRS observé, nous avons comparé un spectre SERRS de la sonde Rup(R6G)₃ à un spectre SERRS de la molécule de R6G seule (Jensen and Schatz 2006). Les deux spectres sont présentés dans la **Figure II – 4**. Un spectre SERRS de l'ADN marqué Rup(R6G)₃ présente 10 pics intenses et bien identifiables, centrés à 615, 640, 774, 1130, 1185, 1312, 1363, 1510, 1571 et 1650 cm⁻¹. Un spectre SERRS de R6G seule (**Fig. II-4 B**) (Jensen and Schatz 2006; Tiwari, Oleg et al. 2007) est caractérisé par 9 bandes de forte intensité, centrées à : 611, 775, 1130, 1185, 1364, 1389, 1505, 1575, et 1649 cm⁻¹. On observe une correspondance quasi parfaite des pics observés (**Figure II-4**), ce qui indique que la présence de l'oligonucléotide a très peu d'influence sur la position des pics SERRS de la R6G.

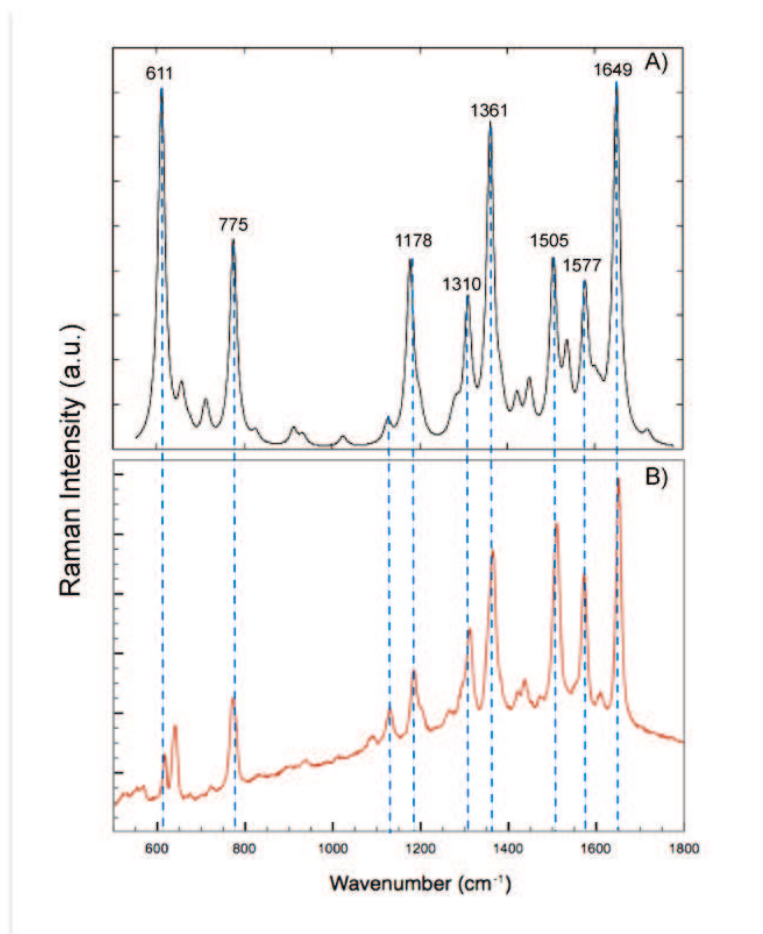


Figure II-4 : Comparaison entre A) un spectre SERRS de Rhodamine 6G seule (modifié d'après Jensen et al., 2006) et B) un spectre SERRS de la sonde Rup(R6G)_3 utilisée dans cette étude.

Toutefois, les rapports d'intensité entre les pics varient très nettement. Par exemple, le pic centré à 611 cm^{-1} est aussi intense que celui centré à 1649 cm^{-1} pour la R6G seule. Ce pic centré à 611 cm^{-1} devient plus de 4 fois moins intense que celui centré à 1649 cm^{-1} sur le spectre SERRS de Rup(R6G)_3 .

Les pics SERRS les plus intenses de la R6G et leur affectation sont reportés dans le **Tableau II-1**.

Tableau II-1 : Attributions des pics SERRS de la Rhodamine 6G les plus intenses (modifié d'après Jensen et al., 2006)

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution des pics
611	Déformation du cycle Xanthene dans le plan et hors du plan
775	Bending hors plan des liaisons C-H Déformation du cycle Xanthene dans le plan
1178	Déformation du cycle Xanthene dans le plan Bending des liaisons C-H et des liaisons N-H
1310	Respiration du cycle Xanthene Bending des liaisons N-H Vibration des groupes CH ₂
1505	Stretching du cycle Xanthene Stretching des C-N Bending des C-H et des N-H
1577	Stretching du cycle Xanthene Bending dans le plan des N-H
1649	Stretching du cycle Xanthene Bending dans le plan des C-H

Dans cette étude, l'aire sous le pic le plus intense du signal de Rup(R6G)₃, centré à 1650 cm⁻¹, sert de proxy à la teneur en ADN marqué.

II. Détection d'un oligonucléotide marqué par SERRS

II.1. Protocole de préparation des échantillons

Le protocole standard de préparation utilisé durant cette thèse est adapté à partir de celui de Faulds et al. (2004). À un mélange de 20 µl d'oligonucléotides marqués et 20 µl de spermine en concentration 10⁻² M, sont ajoutés 500 µl du colloïde d'argent et 500 µl d'eau distillée. Les volumes réactionnels ont été doublés par rapport au protocole de Faulds et al. (2004) afin de travailler dans des conditions plus confortables.

La concentration de spermine a été fixée à 10⁻² M afin d'obtenir un signal fort des molécules d'ADN marquées tout en limitant la contribution de la spermine.

Ce protocole est utilisé pour toutes les mesures sur des échantillons de concentration supérieures à 8,7x10⁻¹⁰ M. Il a par la suite été optimisé afin d'améliorer le seuil de détection.

Une gamme de concentration de 8×10^{-7} M à 4×10^{-12} M a été testée avec succès.

Dans la littérature, il y a parfois une confusion entre concentration initiale d'oligonucléotide marqué et concentration finale dans l'échantillon SERRS analysé. Dans ce travail, toutes les concentrations d'oligonucléotides sont exprimées en **concentrations initiales** avant préparation de l'échantillon SERRS.

II.2. Instrumentation et paramètres de mesure Raman

Toutes les mesures SERRS ont été réalisées au Laboratoire de Géologie de Lyon sur le spectromètre Raman visible LabRam HR800 Horiba-Jobin Yvon®. Il est associé à un laser Spectra Physics® 2018 Ar+/Kr+, dont nous utilisons la longueur d'onde à 514.15 nm comme source d'excitation. Afin de ne pas endommager l'ADN présent dans les échantillons, nous avons réalisé les mesures à faible puissance sur l'échantillon, entre 1.5 et 2 mW.

La configuration de mesure adoptée est représentée en **Figure II – 5**.

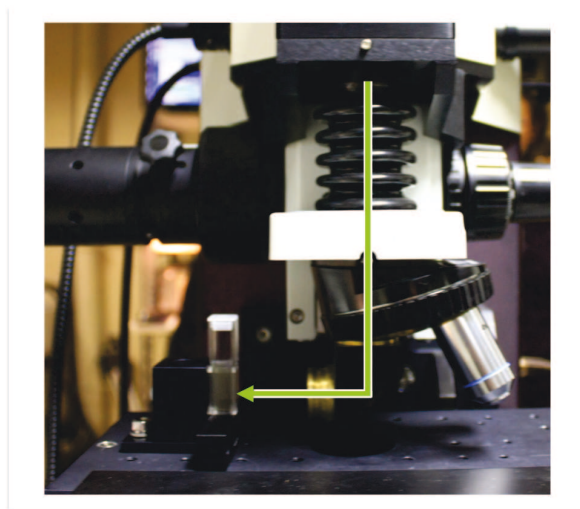


Figure II-5: Géométrie de mesure utilisée. La mesure est réalisée en solution, et un retour à 90° a été installé à la place de l'objectif. Le trajet du laser est marqué par une flèche verte.

L'échantillon est placé verticalement et analysé via un dispositif « retour à 90° ».

II.3. Stabilité temporelle du signal

Afin d'étudier avec la méthode SERRS développée de l'ADN naturel, d'intérêt en paléogénétique par exemple, l'échantillon d'ADN devra pouvoir être préparé dans la plateforme Palgène afin de minimiser les contaminations avant d'être analysé par SERRS au LGL. Cela nécessite que le signal SERRS de la Rhodamine 6G soit stable pour une durée supérieure ou égale à 15 minutes. Or, Graham et al. (2000) rapportent une baisse rapide de l'intensité du signal SERRS pour des concentrations de spermine supérieures à 8×10^{-3} M (Figure II – 6).

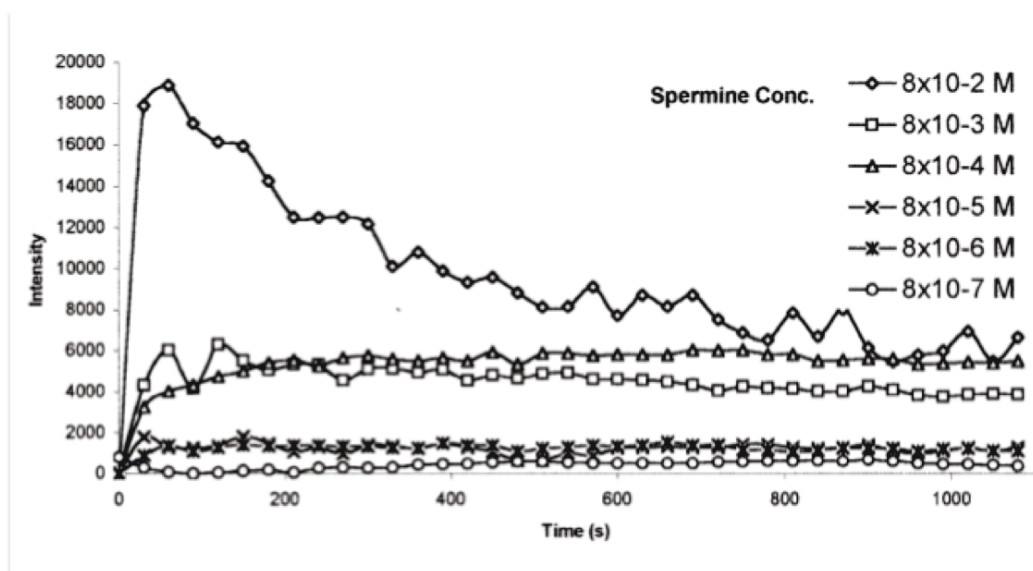


Figure II – 6 : Stabilité temporelle du signal SERRS d'un oligonucléotide marqué par de la rhodamine. Le paramètre pris en compte pour la quantification est l'intensité du pic le plus intense à 1650 cm^{-1} . Concentration en ADN marqué : $2 \times 10^{-9} \text{ M}$; 1 sec d'acquisition toutes les 30 sec. (d'après Graham et al., 2000).

La stabilité du signal SERRS de Rup(R6G)_3 dans le temps a été testée dans 4 types de contenants : un tube cylindrique en quartz de volume 2 ml, une micro-cuve en quartz de volume 45 μl , un capillaire de QPCR de volume 35 μl ainsi que plusieurs cuves de spectrophotométrie en polymères, dont le volume varie entre 2 ml et 500 μl (Figure II – 7).

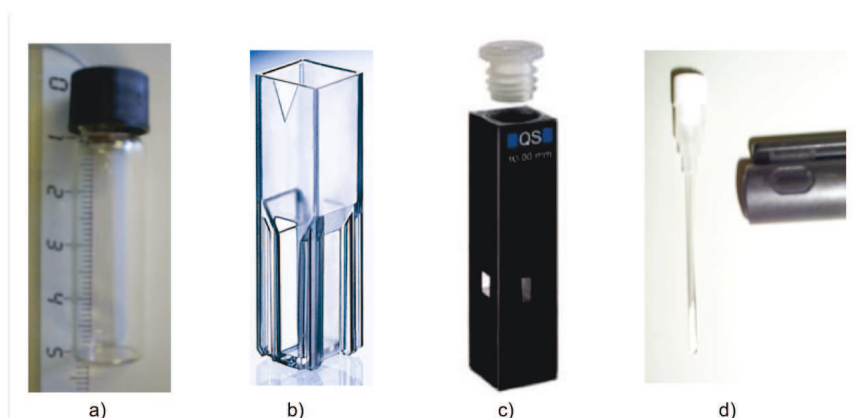


Figure II-7: Contenants testés a) tube en quartz cylindrique; b) cuve de spectrophotométrie (ici en PMMA); c) micro-cuve de précision en quartz; d) capillaire en quartz utilisé en PCR quantitative.

Les spectres SERRS obtenus régulièrement sont traités avec le logiciel Peakfit, et l'intensité du signal est quantifiée à partir de l'aire A_{1650} du pic le plus intense du marqueur R6G centré à 1650 cm^{-1} . Les résultats sont présentés en **Figure II-8**.

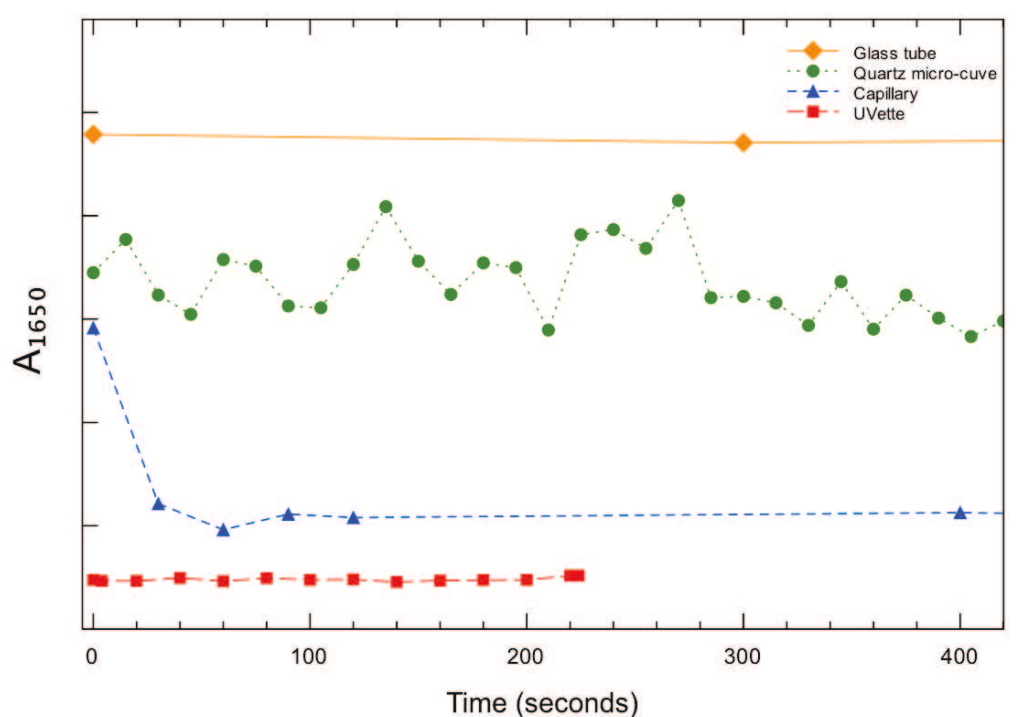


Figure II-8 : Stabilité au cours du temps du signal SERRS d'un échantillon de Rup(R6G)_3 en concentration $8,7 \times 10^{-7}\text{ M}$ dans différents contenants.

Le signal SERRS mesuré est parfaitement stable dans un tube en verre ou dans une cuvette de spectroscopie comme l'UVette. En micro cuve en quartz, on observe une très légère baisse globale du signal, mais le signal est stable durant les 7 premières minutes. En tube capillaire, le signal chute très nettement dans les premières secondes de mesures, puis reste stable à l'échelle des 20 premières minutes. La géométrie du capillaire induit un confinement du liquide qui inhibe la convection que l'on observe dans les autres contenants. On observe donc un phénomène de photodissociation de R6G sous le laser. Les capillaires ne semblent donc pas adaptés à notre étude.

II.4. Risques de contamination

L'analyse d'ADN demande une prudence particulière quant aux contaminations et le contenant utilisé pour les mesures doit être choisi en conséquence.

Le coût élevé des tubes et micro-cuves en quartz rend impossible une utilisation « à usage unique ». Les cuves de spectrophotométrie en plastique sont des supports jetables et peu chers. Des cuves de matières et provenance variées ont été testées en spectroscopie Raman afin d'identifier le signal spécifique du plastique le moins gênant pour les mesures SERRS de R6G. Trois cuves en polystyrène, une en acrylique, une en PMMA (PolyMéthacrylate de Méthyle) ainsi que des UVettes® (Eppendorf, composition non divulguée au public) ont été étudiées. Les spectres Raman de leur paroi sont présentés en **Figure II-9**.

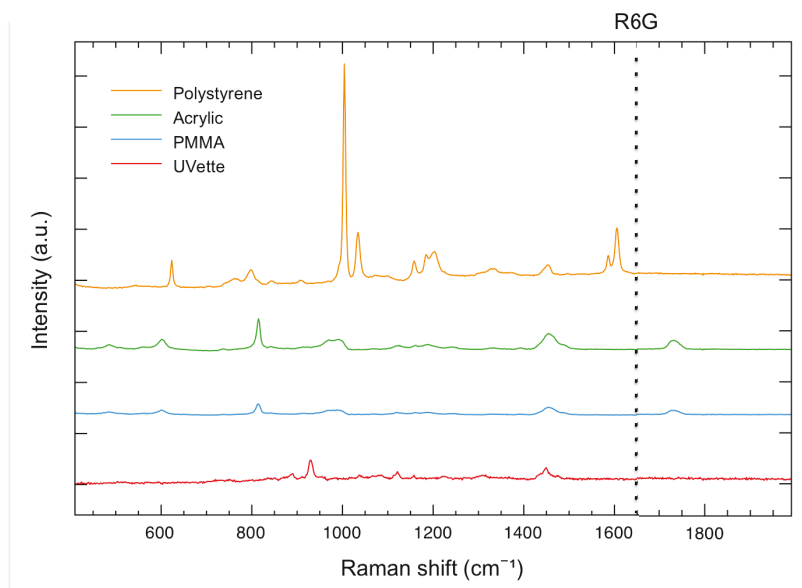


Figure II-9: Spectres Raman des matières plastiques analysées pour choisir un contenant à usage unique. Acquisitions de 10x10 secondes, sauf pour le polystyrène (spectre orange) 3x5 secondes. La ligne noire pointillée marque le centre du pic le plus intense de la R6G à 1650 cm^{-1} .

Nous avons retenu les 2 types de cuves jetables donnant le moins de contribution Raman, particulièrement à l'endroit du pic le plus intense du marqueur SERRS utilisé, la R6G. : **les cuvettes en PMMA et les UVettes.**

Les cuvettes en PMMA ont l'avantage d'être très peu chères (85 euros / 1000 cuvettes) et de ne pas présenter de pics gênants pour la reconnaissance de la Rhodamine 6G. Les spectres acquis dans ce contenant présenteront quoi qu'il arrive les 5 pics caractéristiques du PMMA, centrés à 601, 815, 991, 1454 et 1732 cm^{-1} . Ces pics sont suffisamment éloignés des pics caractéristiques de la R6G pour ne gêner en aucun cas le traitement du signal SERRS obtenu. Les UVettes ont un coût un peu plus élevé (environ 75 euros / 80 UVettes). Cependant, elles ne présentent que 3 pics intenses 929, 1121, 1449 cm^{-1} , et aucun pic dans la région du pic le plus intense de la Rhodamine 6G, 1650 cm^{-1} . Les UVettes sont étudiées pour de plus faibles volumes, allant jusqu'à 50 μl , et pourront donc nous servir par la suite si nous avons affaire à des échantillons à quantité limitée en ADN.

On utilisera en routine les cuvettes en PMMA.

II.5. Limite de détection

Cette étude, réalisée avant le choix du contenant de routine, a été menée dans des tubes cylindriques en verre.

Pour des concentrations de Rup(R6G)_3 allant de $8,7 \times 10^{-7}$ M à $8,7 \cdot 10^{-10}$ M dont les spectres SERRS sont présentés en **Figure II-10**, on utilise le protocole standard, c'est à dire une concentration en spermine de 10^{-2} M.

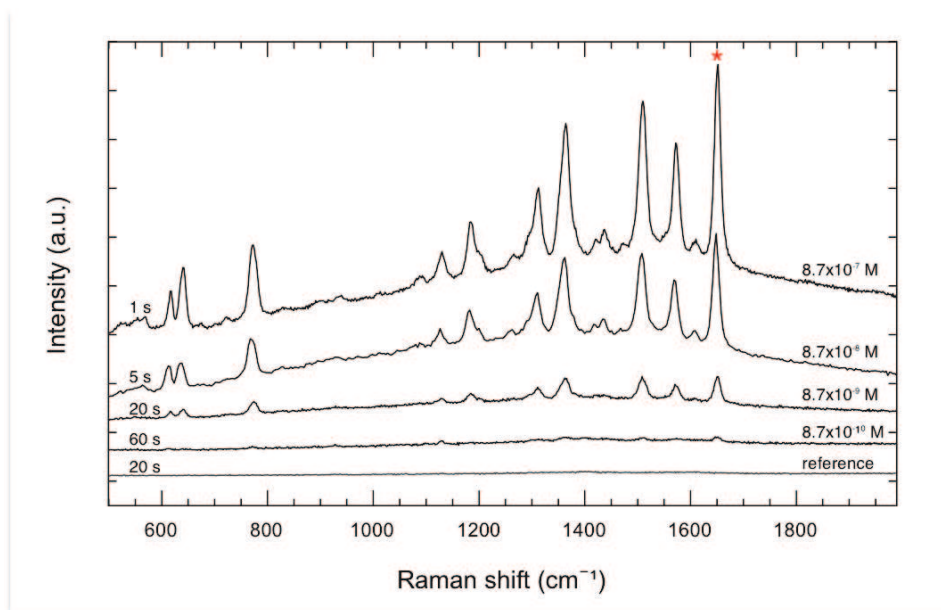


Figure II-10 : Spectres SERRS de Rup(R6G)_3 obtenus pour des concentrations allant de $8,7 \times 10^{-7}$ M à $8,7 \times 10^{-10}$ M, protocole standard. La concentration et la durée d'acquisition sont notées respectivement à droite et à gauche de chaque spectre.

Une quantification de l'ADN peut être obtenue à partir des spectres SERRS à partir de l'aire du pic le plus intense de R6G centré à 1650 cm^{-1} , et notée par la suite A_{1650} . Cette aire A_{1650} est mesurée à l'aide du logiciel Peakfit®. Pour des concentrations $8,7 \times 10^{-7}$ M à $8,7 \times 10^{-10}$ M, l'aire A_{1650} peut être exprimée en fonction de la concentration de Rup(R6G)_3 et du temps d'acquisition t selon la relation suivante :

$$A_{1650} = b C_{\text{Rup(R6G)}_3} t$$

Avec t = temps d'acquisition et $b = 6 \cdot 10^{-9}$ ($r^2 = 0,98$).

Afin d'abaisser la limite de détection de l'oligonucléotide marqué Rup(R6G)₃, nous avons fait varier trois paramètres majeurs.

Premièrement, nous avons fait varier la concentration en spermine, dont le signal apparaît sur les spectres (flèches bleues, **Figure II-11**). La concentration en spermine influence le signal de 2 façons : si la concentration d'ADN marquée est supérieure à 8×10^{-12} M l'intensité du signal augmente quand la concentration de spermine augmente. Cependant, si la concentration d'ADN marqué est inférieure ou égale à 8×10^{-12} M, la spermine contribue au signal Raman. Nous avons donc diminué la concentration de spermine pour les mesures à faibles concentrations d'ADN marqué.

Deuxièmement, nous avons augmenté le rapport V_{ol} / V_{coll} , volume d'échantillon V_{ol} sur volume de colloïde utilisé V_{coll} . Ainsi, à concentration initiale égale, le nombre de molécules d'ADN marqué à détecter dans l'échantillon SERRS est plus grand pour la même surface active en SERS.

Enfin, la puissance laser sur échantillon a été doublée pour les mesures à très faibles concentrations en ADN marqué.

Un récapitulatif des test effectués est fourni dans le **Tableau II-2**, où le protocole standard est noté protocole 1.

Tableau II-2 : Récapitulatif des protocoles de préparation testés. V_{ol} = Volume oligonucléotide ; V_{sp} = volume de spermine ; V_{coll} = Volume de colloïde d'argent ; C_{sp} = concentration en spermine ; P = puissance laser sur échantillon.

Protocole	V_{ol} (μl)	V_{sp} (μl)	V_{coll} (μl)	V_{eau} (μl)	V_{ol}/V_{coll}	C_{sp} (M)	P (mW)
1	20	20	500	500	1/25	10^{-2}	1,5 – 2
2	100	100	250	250	2/5	10^{-2}	1,5 – 2
3	250	250	250	250	1	10^{-2}	1,5 – 2
4	500	250	250	250	2	$5 \cdot 10^{-3}$	1,5 – 2
5	500	250	250	0	2	10^{-2}	1,5 – 2
6	500	250	250	0	2	$5 \cdot 10^{-3}$	3,5

En utilisant le protocole 6 (**Tableau II – 2**), nous avons pu détecter Rup(R6G)_3 jusqu'à une concentration de $3,91 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ (**Figure II-11**). Le protocole 6 bénéficie d'une plus grande puissance laser d'environ 3.5 mW. On note la présence d'un plateau entre 1300 et 1700 cm^{-1} . Ce plateau serait lié à la dégradation des molécules carbonées sous l'effet d'un rayonnement laser (Igor Chourpa, école Teck'co Raman). Le signal de la spermine, présenté en Figure II-3, est également d'avantage présent, malgré sa faible concentration. Les pics les plus intenses de la R6G, notamment celui centré à 1650 cm^{-1} , sont cependant toujours bien visibles.

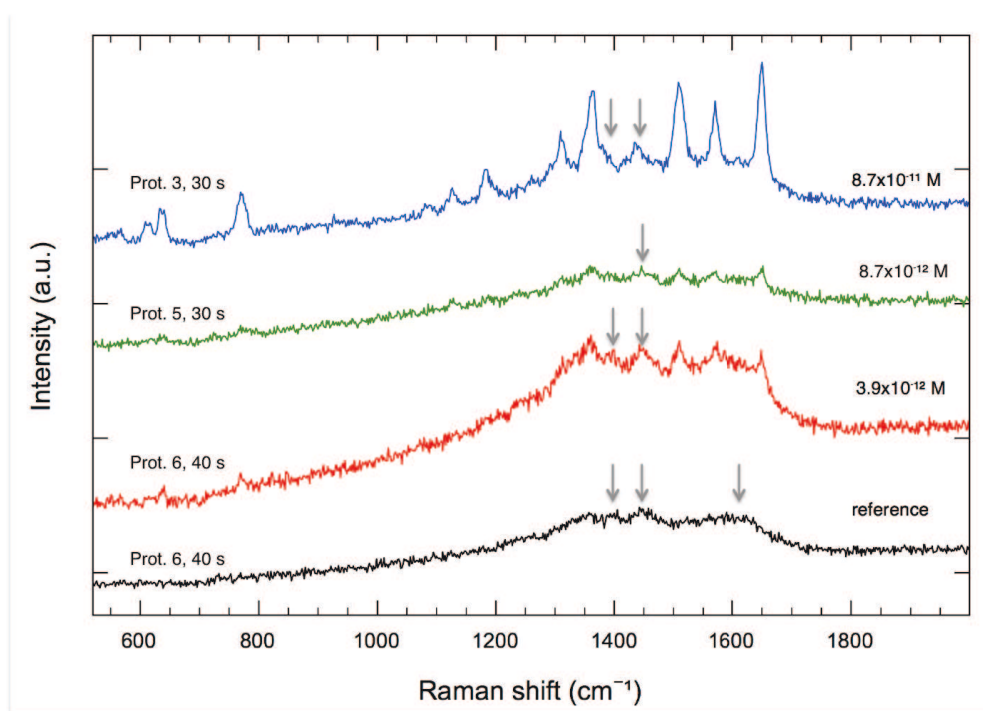


Figure II-11 : Spectres SERRS obtenus pour des concentrations allant de $8,7 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ à $3,9 \cdot 10^{-12} \text{ M}$. Le protocole utilisé, la concentration en ADN marqué et le temps d'acquisition sont annotés sur les spectres. Les bandes Raman de la spermine sont indiquées par une flèche grise.

Nos résultats sont proches de la limite de détection de $1,05 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ atteinte par Faulds et al. (2004).

Conclusion

Nous avons établi et validé une méthode d'analyse qui permettra d'analyser une grande variété de brins d'ADN. Nous détectons par SERRS de l'ADN marqué avec 3 molécules de R6G, et avons mis au point un protocole adapté à l'étude d'ADN en routine. Nous atteignons une limite de détection de l'ordre de 10^{-12} M, en bon accord avec les meilleurs résultats de la littérature (Faulds, Graham et al. 2004; Graham and Faulds 2008). Le signal SERRS obtenu est stable dans le temps et l'ADN peut donc être préparé dans un espace confiné et protégé des contaminations, puis mesuré par SERRS.

Références bibliographiques

- Faulds, K., D. Graham, et al. (2004). "Evaluation of surface-enhanced resonance Raman scattering for quantitative DNA analysis." *Analytical Chemistry* 76(2): 412-417.
- Faulds, K., R. Jarvis, et al. (2008). "Multiplexed detection of six labelled oligonucleotides using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS)." *Analyst* 133(11): 1505-1512.
- Faulds, K., R. E. Littleford, et al. (2004). "Comparison of surface-enhanced resonance Raman scattering from unaggregated and aggregated nanoparticles." *Analytical Chemistry* 76(3): 592-598.
- Faulds, K., F. McKenzie, et al. (2007). "Quantitative simultaneous multianalyte detection of DNA by dual-wavelength surface-enhanced resonance Raman scattering." *Angewandte Chemie-International Edition* 46(11): 1829-1831.
- Faulds, K., L. Stewart, et al. (2005). "Quantitative detection of dye labelled DNA using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS) from silver nanoparticles." *Talanta* 67(3): 667-671.
- Feuerstein, B. G., N. Pattabiraman, et al. (1990). "Molecular Mechanics of the Interactions of Spermine with DNA - DNA Bending as a Result of Ligand-Binding." *Nucleic Acids Research* 18(5): 1271-1282.
- Graham, D. and K. Faulds (2008). "Quantitative SERRS for DNA sequence analysis." *Chemical Society Reviews* 37(5): 1042-1051.
- Graham, D., B. J. Mallinder, et al. (2000). "Detection and identification of labeled DNA by surface enhanced resonance Raman scattering." *Biopolymers* 57(2): 85-91.
- Graham, D., B. J. Mallinder, et al. (2000). "Surface-enhanced resonance Raman scattering as a novel method of DNA discrimination." *Angewandte Chemie-International Edition* 39(6): 1061-+.
- Graham, D., W. E. Smith, et al. (1997). "Selective detection of deoxyribonucleic acid at ultralow concentrations by SERRS." *Analytical Chemistry* 69(22): 4703-4707.
- Jensen, L. and G. C. Schatz (2006). "Resonance Raman scattering of rhodamine 6G as calculated using time-dependent density functional theory." *Journal of Physical Chemistry A* 110(18): 5973-5977.
- Lee, P. C. and D. Meisel (1982). "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols." *Journal of Physical Chemistry* 86(17): 3391-3395.
- Littleford, R. E., G. Dent, et al. (2004). "A comparison of electrochemical and colloidal surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS) from two analytes designed to chemisorb to silver surfaces." *Vibrational Spectroscopy* 35(1-2): 51-57.
- Munro, C. H., W. E. Smith, et al. (1995). "Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman-Scattering." *Langmuir* 11(10): 3712-3720.
- Stokes, R. J., A. Macaskill, et al. (2007). "Quantitative enhanced Raman scattering of labeled DNA from gold and silver nanoparticles." *Small* 3(9): 1593-1601.
- Strelau, K. K., R. Kretschmer, et al. (2010). "SERS as tool for the analysis of DNA-chips in a microfluidic platform." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(4): 1381-1384.
- Tiwari, V. S., T. Oleg, et al. (2007). "Non-resonance: SERS effects of silver colloids with different shapes." *Chemical Physics Letters* 446(1-3): 77-82.
- Vo-Dinh, T., D. L. Stokes, et al. (1999). "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis." *Journal of Raman Spectroscopy* 30(9): 785-793.

Chapitre 3

Détection spécifique d'ADN simple brin par Hybridation-SERRS

I. Introduction

Afin de détecter spécifiquement une séquence d'acides nucléiques, il faut être capable de la reconnaître et de la détecter. Plusieurs solutions sont possibles dont la très classique PCR qui repose sur l'hybridation d'amorces spécifiques, suivie d'une copie enzymatique de la molécule d'intérêt. A l'opposé, d'autres méthodes ne vont pas amplifier la séquence à détecter, mais lui adjoindre spécifiquement une molécule facilement reconnaissable. C'est le cas par exemple de la méthode d'hybridation *in situ* et de détection par fluorescence ou FISH (Fluorescence in situ hybridization) (Pinkel, Landegent et al. 1988). Afin de mettre au point une méthode totalement non-enzymatique nous avons choisi une approche inspirée de la méthode FISH, reposant aussi sur l'hybridation moléculaire mais avec une détection par SERRS, plus sensible que la fluorescence (Faulds, Barbagallo et al. 2004; Sabatte, Keir et al. 2008). Les oligonucléotides marqués par un marqueur SERRS sont alors utilisés comme sondes dans une logique d'hybridation (Vo-Dinh, Houck et al. 1994).

La méthode de détection mise au point par Hybridation-SERRS repose sur l'hybridation de l'ADN cible à 2 sondes oligonucléotidiques. D'une part, une sonde de détection SERRS marquée par un chromophore sera détectée par SERRS. D'autre part, une sonde de capture, marquée par une molécule de biotine, permettra l'immobilisation de la séquence cible et des sondes de détection hybridées sur des billes magnétiques recouvertes de fonctions streptavidine, disponibles commercialement (Life Technologies®). Les contaminants et sondes en excès sont alors éliminés par lavage.

Ensuite les molécules sont remises en solution par une étape d'élution à haute température, qui dissocie la liaison biotine-streptavidine, et dénature les complexes hybridés brin cible - sonde SERRS (Holmberg, Blomstergren et al. 2005). On obtient ainsi une récupération optimale des sondes de détection SERRS. Le signal SERRS final est directement corrélé à la quantité d'ADN cible dans l'échantillon analysé. La méthode permet donc d'identifier et de quantifier des séquences d'ADN simple-brin.

II. Détection d'ADN simple-brin par Hybridation-SERRS

Ce travail fait l'objet d'une publication dans le journal *PlosOne*.

Résumé:

Dans cette étude, nous appliquons la technologie SERRS (Surface Enhanced Resonance Raman Scattering) à la détection spécifique d'ADN. Nous présentons une méthode innovante d'hybridation en sandwich associée à la détection par SERRS. Cette méthode permet la détection spécifique d'ADN sans amplification enzymatique comme la PCR (Polymerase Chain Reaction). En effet, dans certains substrats, notamment les restes anciens ou traités, l'amplification enzymatique échoue à cause de l'altération de l'ADN (dégradation, modification chimique) ou de la présence d'inhibiteurs. Par conséquent, le développement d'une méthode de détection d'ADN spécifique et non-enzymatique permettrait d'éviter de longues et onéreuses tentatives d'amplification parfois non-concluantes. Nous apportons ici la preuve de concept d'une méthode d'hybridation en sandwich associée à la détection par SERRS, menant à la détection spécifique d'une séquence d'ADN de Chamois. Cette méthode montre ainsi son potentiel en tant qu'alternative non-enzymatique aux méthodes d'amplifications de l'ADN, plus particulièrement la PCR, ce qui aura de nombreuses applications dans le domaine de l'identification d'espèces. La quantité et le type de lésions de l'ADN dépendant fortement des conditions de préservation, la méthode SERRS-hybridation

pourrait élargir considérablement la gamme d'échantillons adaptés aux analyses d'ADN. Alors, de nouvelles opportunités s'ouvriraient pour l'étude d'ADN ancien et altéré, dans les domaines de la biologie évolutive et de l'écologie moléculaire, la détection des fraudes alimentaires ou encore la médecine légale (forensics).

A Novel SERRS Sandwich-Hybridization Assay to Detect Specific DNA Target

Cécile Feuillie^{1,9}, Maxime Mohamad Merheb^{2,9}, Benjamin Gillet³, Gilles Montagnac¹, Isabelle Daniel¹, Catherine Hänni^{2*}

1 Laboratoire de Géologie de Lyon - Terre Planètes Environnement, ENS Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France, **2** Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France, **3** Plateforme nationale de Paléogénétique UMS PALGENE, CNRS - ENS de Lyon, Lyon, France

Abstract

In this study, we have applied Surface Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS) technology to the specific detection of DNA. We present an innovative SERRS sandwich-hybridization assay that allows specific DNA detection without any enzymatic amplification, such as is the case with Polymerase Chain Reaction (PCR). In some substrates, such as ancient or processed remains, enzymatic amplification fails due to DNA alteration (degradation, chemical modification) or to the presence of inhibitors. Consequently, the development of a non-enzymatic method, allowing specific DNA detection, could avoid long, expensive and inconclusive amplification trials. Here, we report the proof of concept of a SERRS sandwich-hybridization assay that leads to the detection of a specific chamois DNA. This SERRS assay reveals its potential as a non-enzymatic alternative technology to DNA amplification methods (particularly the PCR method) with several applications for species detection. As the amount and type of damage highly depend on the preservation conditions, the present SERRS assay would enlarge the range of samples suitable for DNA analysis and ultimately would provide exciting new opportunities for the investigation of ancient DNA in the fields of evolutionary biology and molecular ecology, and of altered DNA in food frauds detection and forensics.

Citation: Feuillie C, Merheb MM, Gillet B, Montagnac G, Daniel I, et al. (2011) A Novel SERRS Sandwich-Hybridization Assay to Detect Specific DNA Target. PLoS ONE 6(5): e17847. doi:10.1371/journal.pone.0017847

Editor: Vladimir N. Uversky, University of South Florida, United States of America

Received: November 23, 2010; **Accepted:** February 15, 2011; **Published:** May 31, 2011

Copyright: © 2011 Feuillie et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The Raman spectroscopy facility in Ecole normale supérieure de Lyon is supported by the Institut National des Sciences de l'Univers (INSU). This work was supported by the CNRS interdisciplinary programs (Origin of Life and Planets, Interface physics chemistry biology), ENS de Lyon, INRA and University Lyon 1. C.F. was supported by a grant from ENS de Lyon, and M.M. was supported by ANR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Catherine.Hanni@ens-lyon.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

A wide variety of medical, diagnostic and industrial applications (detection of pathogens [1,2], specific detection of mutations involved in human diseases [3], food quality control (GMO or allergen detection/quantification) [4] rely on nucleic acid analysis. In this context, molecular tools have flourished over the last 20 years [5], especially the development of the efficient and sensitive Polymerase Chain Reaction (PCR) [6,7] procedure to detect minute amounts of DNA. PCR is used in several applied and fundamental research areas, such as paleogenetics. Practically, it consists in the authentication of a DNA sequence extracted from ancient remains (bones, teeth, coproliths) to solve important issues in evolutionary biology and molecular ecology, as DNA sequencing is one of the most efficient molecular methods for species identification. Indeed, species discrimination relies on the high nucleic variability of a specific gene. For instance, the gene encoding mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) [8] is used in a specific PCR amplification of COI fragments combined with amplicon sequencing to identify species of the animal kingdom (DNA barcoding method [9–11]). Although highly efficient on well-preserved DNA templates, PCR often fails

in amplifying ancient DNA molecules which are highly degraded and chemically modified since nucleic acids suffer a range of post-mortem degradations [12–17].

Indeed, two well-known types of DNA degradation, oxidized pyrimidines [13] and cross-links [12], can block the Taq Polymerase elongation activity. This suggests that use of an enzymatic amplification method (PCR, rolling circle [18–20], high-throughput sequencing [21,22]) filters the DNA that is actually detected and studied and further that damaged DNA might be more widely distributed although unavailable for genetic analysis using current methods. Consequently, the development of a non-enzymatic method for detection of specific DNA, even highly degraded, could avoid long, expensive and inconclusive amplification trials. Furthermore, it would enlarge the range of remains suitable for analysis.

In this study, we have applied a Surface Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS) approach as an alternative technology to PCR amplification for the specific detection of DNA. SERRS is a vibrational spectroscopy technique whereby the Raman signal of the compound of interest can be amplified up to 10^{14} fold [23,24]. SERRS-active molecules possess a chromophore with an absorption frequency close to the excitation

frequency, and can adsorb on rough metallic surfaces such as colloidal silver nanoparticles. This adsorption has a doubly positive effect on the Raman signal: (i) it quenches the fluorescence that allows the highly specific Raman fingerprint of the molecule to be detected, (ii) it amplifies the Raman signal. Potential applications of SERRS detection have been under development since 1997 with a view of detecting DNA [25], thus becoming a rapidly emerging field [26]. Our present SERRS sandwich-hybridization assay is based on the specific hybridization of two nucleic probes to target DNA to be detected in solution (Figure 1). The nucleic probe labeled with rhodamine 6G (detection probe) allows the SERRS detection. The second probe, coupled with biotin (capture probe) allows immobilization and purification of the resulting hybridized complex (i.e. target DNA, capture and detection probes). Previous studies have demonstrated that SERRS-labeled synthetic DNA could be detected [25,27], and that SERRS signal is stable after hybridization of a labeled oligonucleotide probe with a target DNA [26]. The sensitivity of SERRS makes it a valuable alternative non-enzymatic tool to detect DNA. We have developed a study model in which the target and control DNA are homologous sequences of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and common goat (*Capra hircus*, a closely related species to *R. rupicapra*), respectively. The results of this new assay shows that DNA of *R. rupicapra* can be specifically discriminated from *C. hircus* at the 10^{-8} M level. Our SERRS sandwich-hybridization assay reveals its potential as a non-enzymatic alternative technology to DNA amplification methods (particularly the PCR method) for species detection with several application fields including: food frauds, forensics or studies of past populations through ancient DNA.

Results and Discussion

Principle of detection

We set up a procedure of double hybridization and immobilization of synthetic target DNA on magnetic microbeads (Figure 1). The capture probe, a biotin labeled sequence of 21 bases hybridizes with target DNA at the 5' end, allowing its immobilization on the surface of the magnetic microbeads through the strong, non-covalent and thus reversible biotin-streptavidin interaction. The SERRS detection probe, a sequence of 22 bases labeled with a single rhodamine 6G (R6G) dye molecule hybridizes with target DNA at the 3' end, allowing detection by Raman spectroscopy. After hybridization and fixation, the sandwich is separated using the magnetic microbeads and is washed to eliminate all unhybridized material. The sandwich is then subjected to denaturation to isolate magnetic microbeads, and to liberate the SERRS probe in solution. The supernatant containing the target DNA, and the complementary capture and detection probes, is then ready to be processed for SERRS measurements as described below.

Concentration study and detection limit of the probe

A concentration study of the detection probe (i.e. nucleic probe labeled with the R6G dye) was performed for concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-6} M, without target DNA. The Raman fingerprint of the R6G probe and of the polymethyl methacrylate (PMMA) cuvette are displayed in Figure 2A. R6G is characterized by 9 Raman peaks, centered at 640, 774, 1130, 1185, 1312, 1363, 1510, 1571 and 1650 cm^{-1} , respectively. Figure 2B plots the peak area beneath the most intense Raman band at 1650 cm^{-1} ,

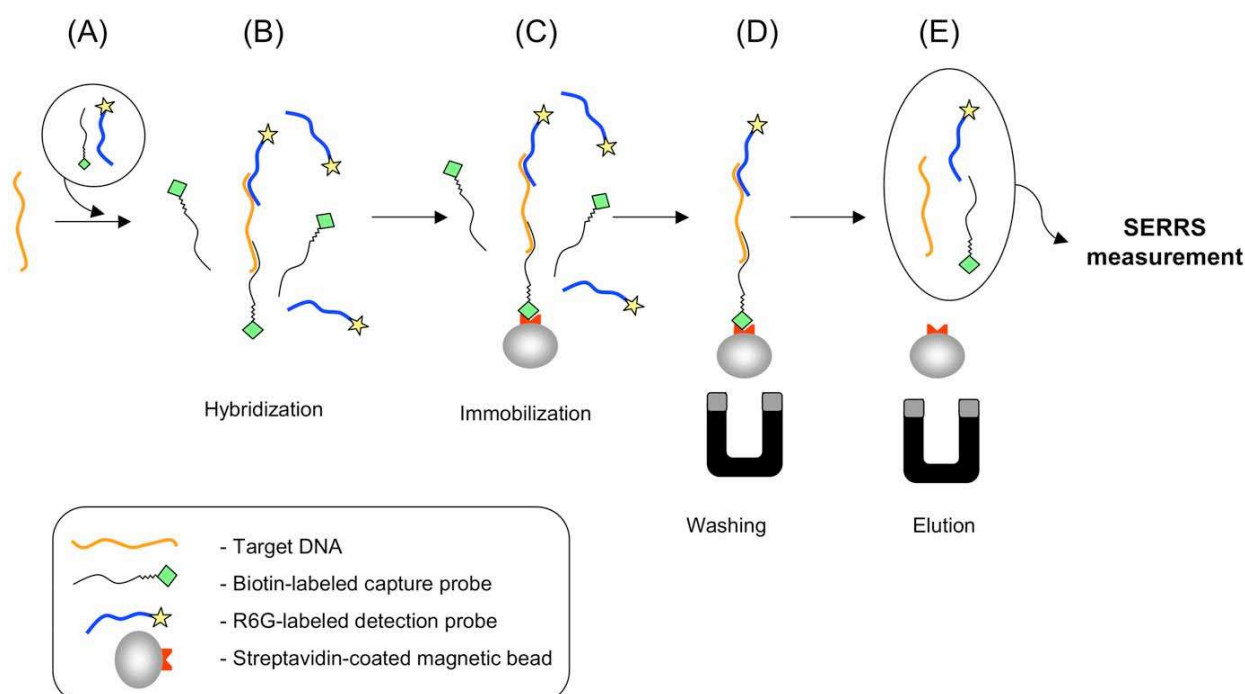


Figure 1. The sandwich-DNA hybridization assay principle. (A) Capture and detection probes are added to the solution of target DNA. (B) After the denaturation step (99°C, 10 minutes), the hybridization of the probes to the DNA target is achieved under gentle agitation (55°C, 3 hours). (C) Streptavidin-coated magnetic micro beads are added to the solution (gentle agitation for 30 minutes at room temperature). (D) Hybridized duplexes are captured by a magnet, unbound compounds are washed out. (E) Hybridized detection probes are eluted (95°C, 20 minutes) and are detected by SERRS in proportion of the initial concentration of target. doi:10.1371/journal.pone.0017847.g001

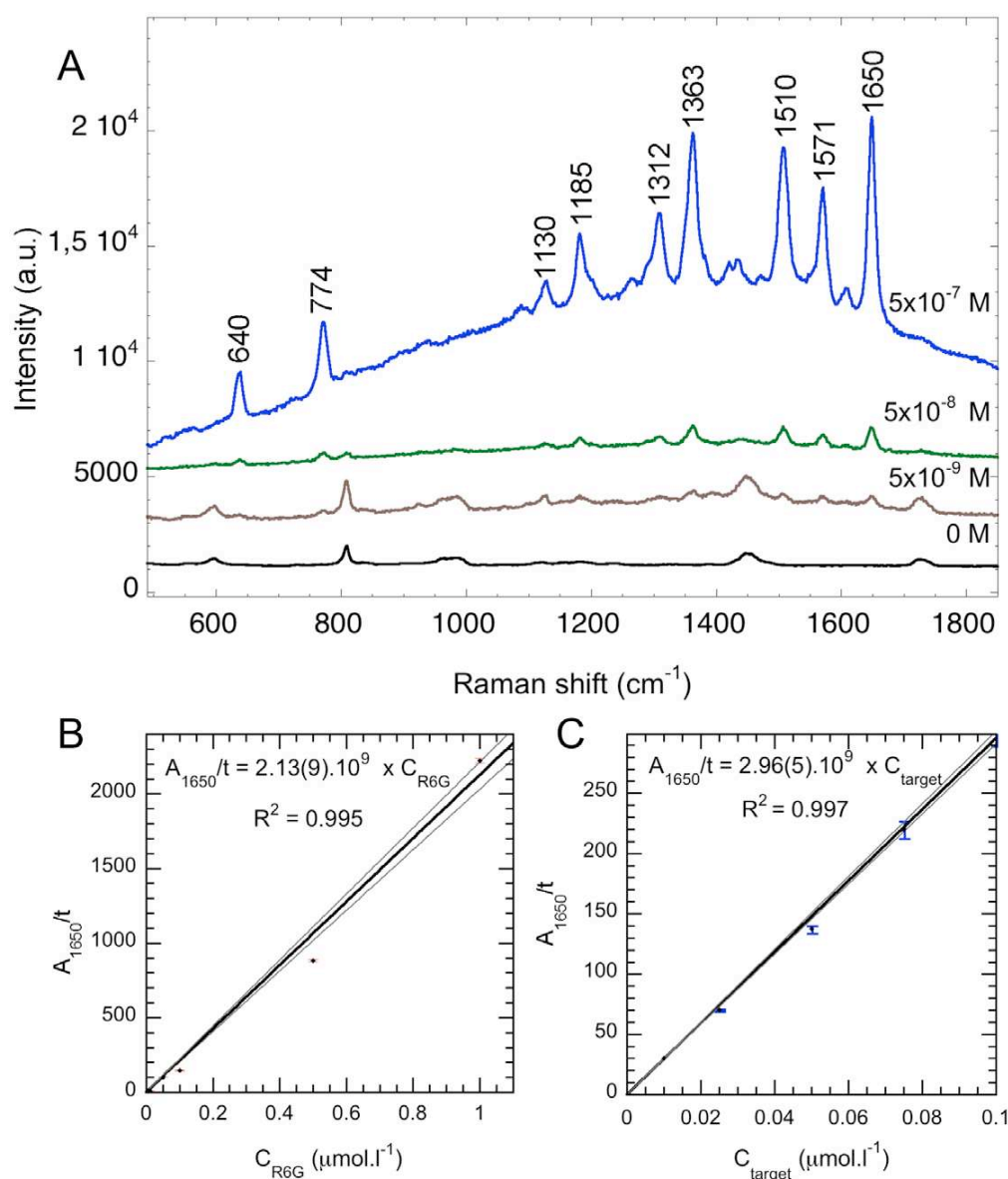


Figure 2. Specific SERRS signals. (A) SERRS spectra of the probe labeled with a single rhodamine 6G (R6G). The peak area beneath the most intense peak at 1650 cm^{-1} (A_{1650}) is the parameter chosen for quantification. The black spectrum is the Raman signal of the PMMA cuvette, appearing in all spectra. Acquisition times for 0 M, 5×10^{-9} M, 5×10^{-8} M and 5×10^{-7} M are 1×15 s, 1×30 s, 1×10 s and 1×10 s, respectively. (B) Dilution study achieved on solutions of R6G probe. Calibration curve of A_{1650} normalized to the acquisition time in second, as a function of the initial concentration of the R6G probe (C_{R6G}). Gray line represent the 1σ deviation. (C) Calibration curve of A_{1650} normalized to the acquisition time in second, as a function of the initial concentration of target DNA. Gray lines represent the 1σ deviation.
doi:10.1371/journal.pone.0017847.g002

hereafter noted A_{1650} , normalized to acquisition time t , as a function of the C_{R6G} concentration of the detection probe. The ratio A_{1650}/t varies linearly with the C_{R6G} concentration, with a slope of $2.13(9) \times 10^9 \text{ cts.s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. This shows that the peak area beneath the most intense Raman band at 1650 cm^{-1} (A_{1650}) allows quantification of the amount of DNA in the solution of interest.

The SERRS sandwich-hybridization assay developed in this study was undertaken on several samples of target *Rupicapra rupicapra* DNA of known concentrations, from 10^{-6} M to 10^{-8} M.

Figure 2C plots A_{1650} normalized to acquisition time t , as a function of the C_{target} concentration of the target DNA initially present in the sample. The A_{1650}/t ratio varies linearly with the C_{target} concentration, with a slope of $2.96(5) \times 10^9 \text{ cts.s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ indicating that this SERRS assay is not only a positive/negative test, but can also be used for quantitative purposes. The intensity of the SERRS signal obtained at the end of the protocol can be used to quantify the initial amount of target DNA.

The detection limit of the SERRS dye (C_{DL}) was calculated from the spectrum acquired on the 10^{-8} diluted solution of detection

probe as described below [28]:

$$C_{DL} = \frac{3 \times \sqrt{I_B}}{I \times \sqrt{t}} \times C_{R6G}$$

where C_{DL} is the concentration at the detection limit, I the R6G dye signal intensity, I_B the background intensity, t the acquisition time, and C_{R6G} the initial concentration of R6G in the solution. We calculate a detection limit of 10^{-10} M, with $I = 1768$ cts, $I_B = 1442$ cts, $t = 30$ s and $C = 10^{-8}$ M, in agreement with the measured detection limit between 10^{-11} and 10^{-10} M.

Specific detection and detection limit of *Rupicapra rupicapra* target

We used the SERRS hybridization assay developed in the present study to detect DNA of chamois at concentrations ranging from 10^{-6} M to 10^{-8} M, respectively (Figure 2C and Figure 3). Negative controls were performed on solutions without target DNA, but containing both the capture and the detection probes, and then treated as described hereafter in experimental procedures (capture and wash steps). Measurements revealed only the plastic cuvette's signal and no specific Raman peak of R6G in the spectrum (Figure 3A). Figure 3C displays the Raman spectrum of the final elution of the SERRS sandwich-hybridization assay carried out on a 10^{-8} M DNA sample of *R. rupicapra*. An intense SERRS signal of the R6G dye is observed with some minor contribution of PMMA from the cuvette. The signal reveals the presence of detection probes that have been, first, hybridized to *R. rupicapra*, then, bound to the magnetic microbeads and finally, released in the elution supernatant. Thus, the SERRS signal indicates the presence of *R. rupicapra* DNA target in the sample.

We used the calibration curve from the concentration study (Figure 2C) to evaluate the yield of the present SERRS sandwich hybridization assay. The SERRS signal obtained after processing a sample of 10^{-8} M *R. rupicapra* leads to a calculated concentration

of $1.15(2) \times 10^{-8}$ indicating that our assay allows for the detection of (*R. rupicapra*) DNA down to concentrations of 10^{-8} M with a yield approaching 100%. The calculated detection limit of our SERRS sandwich hybridization assay is 10^{-10} M of target DNA, which is in excellent agreement with the detection limit of the R6G SERRS probe, i.e. 10^{-10} M.

To assess the specificity of the sandwich-hybridization assay presented in this study, we also tested the homologous region of mitochondrial DNA (12sRNA gene, 138 bp) of the domestic goat (*Capra hircus*) against chamois (*R. rupicapra*, 12sRNA gene, 139 bp) for which the SERRS detection was positive as presented above. More precisely, the sequence of *C. hircus* displays 4 mismatches with the capture probe, and 3 mismatches with the detection probe (Figure 4B). Samples containing either DNA of *C. hircus* only, or an equimolar mix of *R. rupicapra* and *C. hircus* DNA were investigated. The SERRS spectra obtained with 5×10^{-8} M *C. hircus* samples are similar to those of the negative control obtained without target DNA (Figure 3B). The absence of Raman signal from R6G clearly indicates that SERRS probes have been fully washed out during the elution process and confirms the specificity of the present sandwich hybridization assay (no unspecific/aspecific hybridization). Moreover, the Raman spectrum of the sample containing both *R. rupicapra* and *C. hircus* displays the same signal as the *R. rupicapra* sample only (Figure 3D and 3C respectively). This indicates that when the DNA (*C. hircus* in this study) present in a sample is not specific to the capture and detection probes (specific to *R. rupicapra* in this study), or when no DNA is present, the R6G SERRS signal is not observed in the elution solution. On the contrary, when the solution contains target DNA, with or without non-target DNA, a clear SERRS signal is observed (Figure 3), that allows quantification of the amount of target DNA.

Consequently, the sensitivity of the SERRS sandwich-hybridization assay we have developed allows the detection of single-stranded DNA with a yield close to 100%. This approach leads to

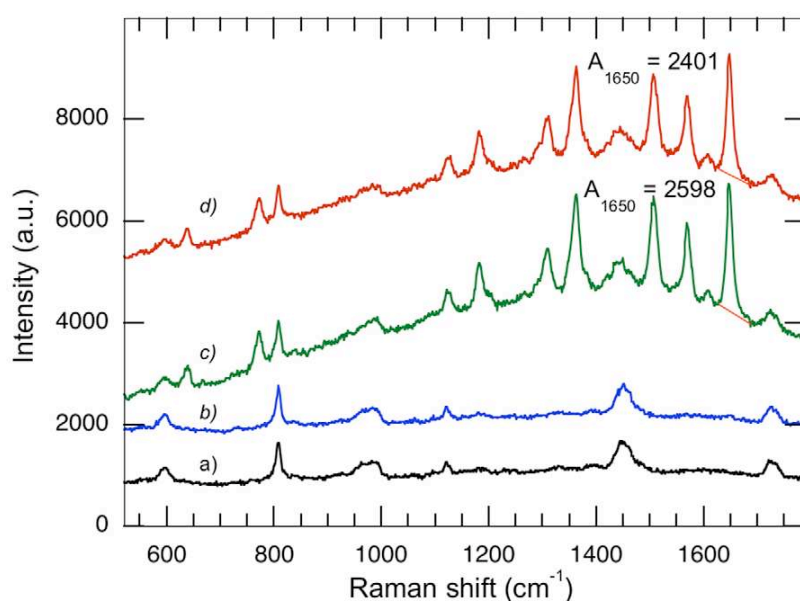


Figure 3. Specificity and co-contamination assays. All spectra were acquired in 1 acquisition of 30 s. (A) In black, negative control without target DNA. (B) In blue, *C. hircus*, negative control ($5 \cdot 10^{-8}$ M). (C) In green, signal from *R. rupicapra* ($5 \cdot 10^{-8}$ M). (D) In red, signal obtained from an equimolar mix of *R. rupicapra* and *C. hircus* DNA ($5 \cdot 10^{-8}$ M each). doi:10.1371/journal.pone.0017847.g003

A

Sequence Label	Sequence	Length (bases)	Modification
Capture probe	GTGTCCTGTATTCACTTGAGG	21	3'-TEG-biotin
Detection probe	TGTTACGACTTGCTCCTCTTG	22	5'-HEG-R6G
Target DNA (<i>R. rupicapra</i>)	GCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCT CAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCTATTTAAACA CACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAG GTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACAAAC	139	None
Non-target DNA (<i>C. hircus</i>)	GCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCT CAAGTAAATACAATGCACTCAAGCCTATTAACACGC ATCAACTACATGAGAGGAGATAAGTCGTAACAAGG TAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGATAAAT	138	None

B

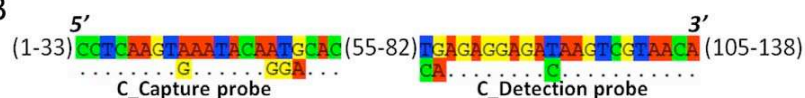


Figure 4. Probes and DNA characteristics. (A) Probes and DNA sequences. (B) Alignment of Non target DNA (*C. hircus*) sequence with complement sequences of Capture probe and Detection probe. Numbers present non-effective bases in the Non target DNA sequence. doi:10.1371/journal.pone.0017847.g004

specifically distinguishing DNA of very closely related species (*R. rupicapra* and *C. hircus*) at concentrations of at least 10^{-8} M.

The success of the present SERRS sandwich-hybridization assay in detecting specific DNA of *R. rupicapra* suggests that it could be developed and applied either as an initial test, prior to PCR, or as an alternative DNA detection method, when the activity of the Taq polymerase is inhibited [29,30]. DNA extracts from many substrates (bones [31], teeth [32], coproliths [33], soil [34], sediments [35]...) are often co-extracted with PCR inhibitors especially in fields like paleogenetics [36–39], forensics [40] and medical analysis [41].

Such samples could be tested by the SERRS sandwich-hybridization assay to check the presence of specific target DNA, without a further DNA purification step, often critical for the recovery of DNA. For instance, environmental studies might benefit from this assay.

The most promising perspective for this SERRS sandwich-hybridization assay is that degraded DNA, unavailable for PCR amplification, could still be specifically detected. Indeed, the elongation by Taq polymerase is blocked if the template of interest contains consecutive abasic sites [42], cross-links [12], or a high amount of oxidized pyrimidines [13] – which is the case in most degraded substrates. This suggests that highly degraded DNA is currently only analyzed through the filter of PCR amplification whereas it may be widely distributed in substrates with levels of damage precluding genetic analysis by PCR. Our SERRS sandwich-hybridization assay, based on complementary hybridization, and therefore independent of the occurrence of abasic sites or oxidized bases, could allow for successful analysis of samples unsuitable for PCR, as it often occurs in paleogenetics. Samples that have been discarded from further PCR investigation because

they appeared too degraded could be successfully analyzed by the SERRS sandwich-hybridization assay. As the amount and type of damage highly depends on the preservation conditions [16], the present SERRS assay would considerably enlarge the range of ancient samples suitable for DNA analysis.

Materials and Methods

Design of oligonucleotide probes

We used as target DNA a 139 base sequence of mitochondrial DNA (12sRNA gene) of *Rupicapra rupicapra* (chamois) (Figure 4A). Specificity controls were achieved by studying a homologous sequence of 138 bases of the same region of mitochondrial genome in *Capra hircus* (common goat). Chamois and goat were chosen because they are closely related (Figure 4B), and because none of them are usual contaminants (e.g. pig *Sus scrofa*, bovid *Bos taurus*, chicken *Gallus gallus*,...). These sequences as well as the SERRS 22-mer oligonucleotide labeled with one molecule of rhodamine 6G (detection probe), and the biotin labeled 21-mer oligonucleotide (capture probe) were purchased from Eurogentec®.

Sequences were aligned taking advantage of the Seaview software [43]. Capture and detection probes were designed to be specific of *R. rupicapra*. The 21-mer biotin probe is modified with 3'-biotin that is linked to the oligonucleotide via the 9-atom spacer: triethylene glycol (TEG) that provides the biotin with good accessibility to the streptavidin-coated magnetic microbeads. The 22-mer SERRS probe is modified with 5'-rhodamine 6G (R6G) which is linked to the oligonucleotide via the 18-atom spacer: hexaethylene glycol (HEG). Such a long spacer is necessary to avoid disturbing the hybridization when relatively high weight molecules like rhodamine 6G are linked.

Reagents

All reagents were analytical grade. Sodium Dodecyl Sulfate 10% (SDS, #L4522), tetrahydrochloride spermine (Fluka, #85610), Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20, #P1379) and silver nitrate 99.999% (#S8157) were purchased from Sigma-Aldrich®, 1% trisodium citrate (#S1804) was from Fisher®, Ultra pure™ 20×SSC Buffer (Gibco, #15557-044), Streptavidin-coated magnetic microbeads (Dyna®), Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, #650-02, 10 mg.ml⁻¹, 2 ml, 7–12×10⁹ beads and the matching DynaMag™-2 magnetic separator (Dyna®, #123-21D) were purchased from Invitrogen®.

Sandwich hybridization and immobilization

A 4×SSC, Tween 20 (0.05%) buffer was used for hybridization, activation by washing the microbeads before use to remove the sodium azide from the storing buffer of the magnetic beads, immobilization and elution. The sandwich hybridization was performed in a single step as described hereafter: 10 µl of target DNA solution (concentration ranging from 10⁻⁸ to 10⁻⁷ M) were mixed with 10 µl of the capture probe and 10 µl of the detection probe (both in excess ×10, probes solutions concentration depending on the concentration of target DNA) in 30 µl buffer (Figure 1A) and heated to 99°C for 10 minutes to ensure denaturation of potential hairpins or autohybridized DNA. During the hybridization step, the samples were placed under continuous gentle stirring at 55°C for 3 hours (Figure 1B).

Meanwhile, series of 25 µl of the stock solution (10 mg/ml) of magnetic microbeads were rinsed three times in 25 µl of the buffer using the magnetic separator. Microbeads are then resuspended in 10 µl buffer, and added to the hybridization solution for immobilization under gentle continuous stirring for 30 minutes at room temperature (Figure 1C). The beads were finally washed twice in 200 µl of a 0.25×SSC, Tween 20 (0.5%) buffer using the magnetic separator to remove the unbound material (Figure 1D). The salinity of the washing buffer was chosen to optimize the specificity of our assay without any significant loss of material.

Prior to SERRS measurements, a final elution step is required to isolate the hybridized SERRS probes from the microbeads (Figure 1E). Beads re-suspended in 60 µl buffer are therefore heated at 95°C for 20 minutes for denaturation of both the DNA sandwich and the biotin-streptavidin bound [44]. The microbeads are then immobilized by the magnetic separator, and the supernatant is collected for SERRS measurements.

SERRS measurements

The silver colloid used for SERRS measurements was prepared according to the Lee and Meisel protocol [45]. 90 mg of silver

nitrate AgNO₃ were dissolved in 500 ml of distilled water and subsequently heated under continuous stirring until ebullition. 10 ml of sodium citrate solution (1%) were then added. The solution was maintained at boiling for 90 minutes. The solution was clear at the beginning, and progressively took the appropriate grayish yellow color. The silver colloid has been stored in the dark at room temperature. The silver colloid aliquots used in this study were from the same batch.

The same protocol is used for measurements of detection probes in solution for both the R6G probe dilution assay and for the SERRS sandwich-hybridization assay. The eluted R6G probes contained in the supernatant were analyzed following a protocol modified from Faulds *et al.* [46]. Spermine concentration was decreased by one order of magnitude in order to minimize its contribution to the Raman signal. Nevertheless, it is still high enough (i) to act as an efficient aggregating agent of the silver colloid for generating hot spots and (ii) to neutralize DNA backbone negative charges allowing a better adsorption onto the metallic surface [25]. Thus, 20 µl of the supernatant was mixed with 20 µl of spermine (10⁻² mol.l⁻¹) in a single-use PMMA spectroscopy cuvette. 500 µl of silver colloid and 500 µl of distilled water were then added, and the solution was homogenized prior to SERRS measurement.

Samples were analyzed with a visible Jobin Yvon® LabRam HR 800 Raman spectrometer, coupled to a Spectra Physics® 2018Ar⁺/Kr⁺ laser tuned at 514.5 nm (LST, ENS de Lyon). The laser power on the sample was chosen between 1.5 and 2 mW. The spectra were acquired with a spectrometer grating of 600 gr.mm⁻¹ centered at 1100 cm⁻¹. Spectra were the result of 10×1 second to 1×30 seconds accumulation, depending on the concentration of the SERRS probe. Spectra were processed with Peakfit®, a software dedicated to peak detection, separation and analysis (Systat Software Inc).

Acknowledgments

We would like to thank M-T. Charreyre, V. Laudet, P. Oger and L. Orlando for fruitful discussions, and the entire Paleogenetics and Molecular Evolution team at the IGFL for technical support. We warmly thank Joanne Burden for improving the English in the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CH ID MM BG CF. Performed the experiments: CF MM BG GM. Analyzed the data: CF MM ID BG CH. Contributed reagents/materials/analysis tools: CH ID BG GM MM CF. Wrote the paper: CF MM ID BG CH.

References

- Scheu PM, Berghof K, Stahl U (1998) Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food microbiology* 15: 13–31.
- Jiang SC, Chu W (2004) PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *Journal of Applied Microbiology* 97: 17–28.
- Mulder J, McKinney N, Christopherson C, Sninsky J, Greenfield L, et al. (1994) Rapid and Simple PCR Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma Application to Acute Retroviral Infection. *Journal of clinical microbiology* 32: 292–300.
- Pafundo S, Gulli M, Marmiroli N (2010) Multiplex real-time PCR using SYBR® GreenER™ for the detection of DNA allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 1831–1839.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313–321.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn G, et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263–273.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2006) DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology and evolution* 24: 110–117.
- Zhang J, Wang J, Xia T, Zhou S (2009) DNA barcoding: species delimitation in tree peonies. *Sci China C Life Sci* 52: 568–578.
- Hajibabaei M, Singer GA, Hebert PD, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet* 23: 167–172.
- Smith MA, Fisher BL, Hebert PD (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1825–1834.
- Paäbo S (1989) Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1939–1943.
- Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdareoglu M, Paäbo S (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 24: 1304–1307.
- Orlando L, Hänni C (2000) Du nouveau pour l'ADN ancien. *Société française de génétique* 16: I–XVI.
- Mitchell D, Willerslev E, Hansen A (2005) Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research* 571: 265–276.

A Novel SERRS Assay to Detect Specific DNA

16. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S (2001) Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2: 353–359.
17. Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archeology. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 264: 9709–9712.
18. Gilbert W, Dressler D (1968) DNA Replication: The Rolling Circle Model. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 33: 473–484.
19. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS (2001) Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. *Genome Research* 11: 1095–1099.
20. Tanner NK, Schaff S, Thill G, Petit-Koskas E, Crain-Denoyelle A-M, et al. (1994) A three-dimensional model of hepatitis delta virus ribozyme based on biochemical and mutational analyses. *Curr Biol* 4: 488–498.
21. Rothberg JM, Leamon JH (2008) The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol* 26: 1117–1124.
22. Ermini L, Olivieri C, Rizzi E, Corti G, Bonnal R, et al. (2008) Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Curr Biol* 18: 1687–1693.
23. Nie S, Emory SR (1997) Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* 275: 1102–1106.
24. Maher RC, Cohen LF, Etchegoin P (2001) Single molecule photo-bleaching observed by surface enhanced resonant Raman scattering (SERRS). *Chemical Physics Letters* 352: 378–384.
25. Graham D, Smith WE, Linacre AMT, Munro CH, Watson ND, et al. (1997) Selective Detection of Deoxyribonucleic Acid at Ultralow Concentrations by SERRS. *Analytical Chemistry* 69: 4703–4707.
26. Graham D, Thompson DJ, Smith WE, Faulds K (2008) Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles. *Nature nanotechnology* 3: 548–551.
27. Faulds K, Smith WE, Graham D (2004) Evaluation of SERRS for quantitative DNA analysis. *Analytical Chemistry* 76: 412–417.
28. Haller M, Knochel A (1996) X-ray fluorescence analysis using synchrotron radiation (SYXRF). *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 14: 461–488.
29. Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63: 3741–3751.
30. Shuter GG, Gagnon P, Verret G, Kalyn H, Korkosh S, et al. (1999) Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J Forensic Sci* 44: 623–626.
31. Krause J, Lalueza-Fox C, Orlando L, Enard W, Green RE, et al. (2007) The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Curr Biol* 17: 1908–1912.
32. Rohland N, Hofreiter M (2007) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* 2: 1756–1762.
33. Poinar H, Kuch M, McDonald G, Martin P, Pääbo S (2003) Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol* 13: 1150–1152.
34. Stokstad E (2003) Paleontology. Ancient DNA pulled from soil. *Science* 300: 407.
35. Haile J, Holdaway R, Oliver K, Bunce M, Gilbert MT, et al. (2007) Ancient DNA chronology within sediment deposits: are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Mol Biol Evol* 24: 982–989.
36. Hofreiter M, Stewart J (2009) Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. *Curr Biol* 19: R584–594.
37. Gilbert MT, Wilson AS, Bunce M, Hansen AJ, Willerslev E, et al. (2004) Ancient mitochondrial DNA from hair. *Curr Biol* 14: R463–464.
38. Cooper A, Drummond AJ, Willerslev E (2004) Ancient DNA: would the real Neandertal please stand up? *Curr Biol* 14: R431–433.
39. Loreille O, Orlando L, Patou-Mathis M, Philippe M, Taberlet P, et al. (2001) Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Curr Biol* 11: 200–203.
40. Hudlow WR, Chong MD, Swango KL, Timken MD, Buoncristiani MR (2008) A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: a diagnostic tool for STR typing. *Forensic Sci Int Genet* 2: 108–125.
41. Das A, Spackman E, Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL (2009) Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of Avian influenza virus by RT-PCR. *J Vet Diagn Invest* 21: 771–778.
42. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, Denvir J (2004) Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method. *Biochemical and Biophysical Research Communications Volume* 323: 823–830.
43. Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12: 543–548.
44. Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundberg J, et al. (2005) The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* 26: 501–510.
45. Lee PC, Meisel D (1982) Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J Phys Chem* 2: 3391–3395.
46. Faulds K, Stewart L, Smith WE, Graham D (2005) Quantitative detection of dye-labelled DNA using SERRS from silver nanoparticles. *Talanta* 67: 667–671.

III. Compléments expérimentaux

III.1. Résistance de la sonde SERRS aux hautes températures

Afin d'assurer la disponibilité de l'ADN cible pour une hybridation avec des sondes nucléiques spécifiques, une étape de dénaturation à haute température est nécessaire pour s'affranchir des éventuelles structures secondaires comme les épingles à cheveux, les boucles... L'hybridation *s.s.* s'effectue à une température proche de la T_m ou « melting temperature » des sondes. Pour des oligonucléotides d'une vingtaine de bases, cette température est de 50°C environ.

Nous avons donc vérifié que la sonde R6G et son signal SERRS résistent à de telles températures. Pour cela, des aliquots de 30 μ l d'une solution de la sonde Rup(R6G)_3 de concentration 8.7×10^{-7} M sont placés dans un thermocycleur à température constante choisie entre 50 et 92°C pendant 10 min, puis 1 minute à 22°C. Après un passage dans la glace immédiatement après la sortie du thermocycleur pour bloquer toute évolution du système, ces aliquots sont analysés en SERRS selon le protocole standard. Les spectres mesurés ont été traités grâce au logiciel Peakfit, afin d'obtenir l'aire A_{1650} du pic le plus intense caractéristique de la R6G centré à 1650 cm^{-1} et de quantifier l'évolution du signal SERRS. La solution initiale analysée à température ambiante est utilisée comme référence pour normaliser le signal. L'évolution du signal SERRS en fonction de la température maximale appliquée pendant 10 min est présentée en **Figure III-1**.

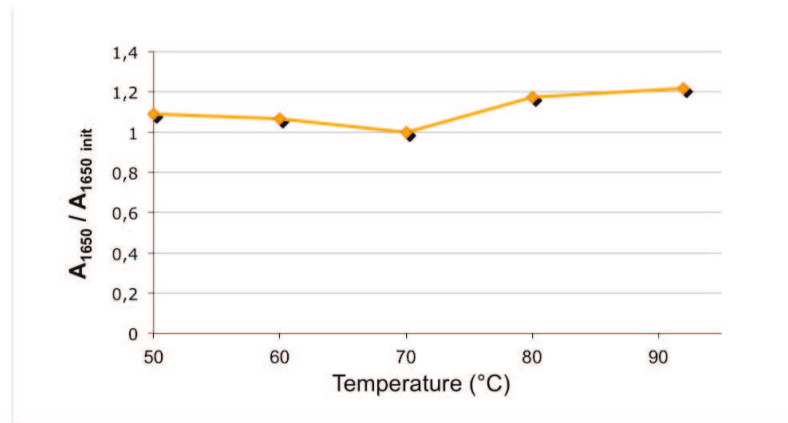


Figure III-1 : Evolution en fonction de T max du signal SERRS représenté comme l'aire A_{1650} normalisée à celle à température ambiante.

On n'observe pas de changement significatif du signal, ce qui indique que le passage de la Rhodamine 6G à haute température jusqu'à 92°C n'entraîne pas de perte de signal SERRS. Par conséquent, un protocole d'hybridation standard est possible.

III.2. Choix des séquences cibles

Nous avons choisi de travailler sur un modèle impliquant 2 espèces très proches, le chamois (*Rupicapra rupicapra*) et la chèvre (*Capra hircus*). La région ciblée est une partie de l'ADN mitochondrial, plus abondant que l'ADN nucléaire dans les cellules. Une cellule animale contient entre 800 et 1000 mitochondries, chacune ayant de 2 à 6 molécules d'ADN circulaire (Gardner 1984). Statistiquement, l'ADN le plus probable est donc l'ADN mitochondrial. De plus, l'ADN mitochondrial évolue plus vite que l'ADN nucléaire, ce qui permet d'obtenir sur une région de taille restreinte la variabilité nécessaire à la discrimination d'espèces proches. Nous nous intéressons plus particulièrement au gène codant pour l'ARN ribosomal 12S, dont l'étude permet d'identifier et de discriminer des séquences d'ADN proches (Girish, Anjaneyulu et al. 2004; Pegels, Gonzalez et al. 2011).

Les séquences des espèces d'intérêt, ici chamois et chèvre, sont téléchargées sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information), qui met à disposition une

bibliothèque de toutes les parties de génomes séquencées jusqu'à présent en ligne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). On utilise le logiciel Seaview (Galtier, Gouy et al. 1996; Gouy, Guindon et al. 2010), qui permet d'aligner manuellement ou automatiquement des séquences d'acides nucléiques ou de protéines. Les séquences peuvent être directement téléchargées en format FASTA, qui est lu par Seaview sans avoir besoin de le convertir au format texte.

Le but étant de travailler sur une séquence spécifique uniquement de l'espèce visée, on recherche une zone où la séquence d'intérêt présente plusieurs **différences**, ou **mismatches**, par rapport aux séquences de contaminants courants, afin de limiter considérablement le risque de contaminations. Le principal contaminant à considérer est l'humain *Homo sapiens*. Le porc *Sus scrofa*, le bœuf *Bos taurus*, le poulet *Gallus gallus*... sont également considérés comme des contaminants universels, en raison de leur omniprésence dans notre alimentation. Nous avons ainsi choisi de travailler sur une séquence d'ADN mitochondrial de chamois (*Rupicapra rupicapra*) de 139 bases (gène du 12S RNA). Une séquence d'ADN mitochondrial de 138 bases de *Capra hircus* (chèvre), homologue à notre séquence d'ADN cible, sert de contrôle de spécificité de la méthode. Elle diffère de la séquence cible par 1 délétion et 14 mismatches, dont seulement 4 sont situées dans la zone d'hybridation de la sonde de capture et 3 dans la zone d'hybridation de la sonde de détection. On étudiera donc des échantillons d'ADN cible, des échantillons d'ADN non-cible, ainsi que des mélanges de ces 2 séquences d'ADN.

III.3. Choix des sondes de capture et de détection

Il faut choisir des sondes de 20 bases environ qui vont devoir s'y hybrider à la séquence cible. Elles doivent être spécifiques de la séquence cible uniquement, et donc présenter des mismatches par rapport aux séquences d'autres espèces.

En pratique, les sondes seront plus efficaces si les mismatches sont situées au milieu de la sonde. En effet si la sonde tente de s'hybrider à de l'ADN non-cible, la présence de mismatches au milieu induira un décollement des brins tandis que la présence de mismatches à l'extrémité des sondes ne sera pas forcément décisive. Ceci diffère fortement du design d'amorces de PCR, où les mismatches doivent être préférentiellement situées à l'extrémité 3' afin que la *Taq* polymérase ne puisse pas initier l'élongation si le primer se fixe sur une séquence autre que la séquence d'intérêt.

Afin d'optimiser l'hybridation, les sondes sont choisies de préférence avec des températures d'hybridation proches. La température d'hybridation d'une séquence, ou T_m , est notamment corrélée à la proportion de G et C.

La spécificité des séquences des sondes choisies est vérifiée grâce à l'outil BLAST, disponible en ligne (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pour obtenir les résultats les plus complets possibles, sélectionner « Nucleotide, Other genomes ». Les séquences des sondes seront comparées à tous les génomes disponibles sur le site NCBI. Selon les résultats du BLAST, on valide ou non les sondes choisies.

On s'assure également que les séquences choisies ne s'autohybrident pas, ou ne forment pas de structures secondaires telles que des épingles à cheveux (hairpins) ou des boucles (loops) grâce à un calculateur en ligne (<http://yellow.nist.gov:8444/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>) Cet outil calcule également la température d'hybridation optimale pour les séquences considérées.

IV. Optimisation du protocole d'hybridation

Les expériences d'hybridation-fixation sont réalisées dans une solution de chlorure de sodium et de citrate de sodium appelé SSC (saline sodium citrate). On l'utilise en concentration 4xSSC, qui correspond à 0.6 M de NaCl et 60 mM de trisodium citrate. Les billes magnétiques à fonction streptavidine ont en effet une utilisation optimale dans un milieu de 4xSSC. Nous avons donc choisi de réaliser l'hybridation aussi dans un tampon de salinité 4xSSC, afin de garder le même milieu pour hybridation et fixation.

Nous avons optimisé la spécificité de notre méthode en agissant sur le volume et le nombre de lavages, l'utilisation ou non d'un surfactant durant hybridation, fixation et lavages, ainsi que sur la salinité du milieu de lavage.

IV.1. Réduction de l'adsorption non spécifique

IV.1.1. Optimisation de l'étape de lavage

Nous avons optimisé l'étape de lavage afin d'éliminer la variabilité des témoins.

Le volume de milieu de lavage utilisé pour rincer les billes est compris entre 150 et 200 μ l afin que les billes soient constamment immergées même lorsque l'on les immobilise sur le rack magnétique. Cela permet d'être certain que toutes les billes ont été lavées, ce qui n'est pas forcément le cas si une partie des billes est immobilisée au dessus de la surface du liquide. De plus, plus le volume de lavage est grand, plus il permet de diluer d'éventuelles traces résiduelles, améliorant également la spécificité de notre méthode.

Une seule étape de lavage mène parfois à l'obtention d'un fort signal SERRS de R6G même lors de l'analyse d'un échantillon dépourvu d'ADN cible. La totalité des molécules non-hybridées n'est donc pas systématiquement éliminée dès le premier lavage. Nous avons montré que les solutions du 3^e lavage sont systématiquement vides du signal SERRS de la Rhodamine 6G. Cela indique une élimination totale des molécules non-spécifiquement fixées au deuxième lavage. Notre protocole comprend donc deux étapes de lavage.

IV.1.2. Composition du milieu de lavage et ajout d'un surfactant

Afin de s'affranchir de l'**adsorption non-spécifique** et ainsi ne pas risquer d'obtenir des résultats « faux positifs », nous avons testé différents milieux d'hybridation et de lavages. L'ajout d'un surfactant, le Tween 20 ou Polysorbate 20, permet de s'affranchir de la majorité de cette adsorption aspécifique. L'utilisation de Tween 20 est préconisée par l'équipe de Graham (Faulds, Graham et al. 2004). La CMC (Critical Micell Concentration) du Tween 20 étant de 0.059 mM (0.0072 %), des micelles ne se forment qu'au dessus de cette concentration limite. On se placera donc à 0.05 % en Tween 20. Deux milieux de lavage ont été testés avec et sans surfactant, une solution de SSC et une solution d'éthanol. Les tests ont été effectués sur des échantillons témoins ne contenant pas d'ADN cible mais uniquement la sonde de détection. L'hybridation et la fixation se font toujours à salinité 4xSSC. Les résultats sont présentés en **Figure III-2**.

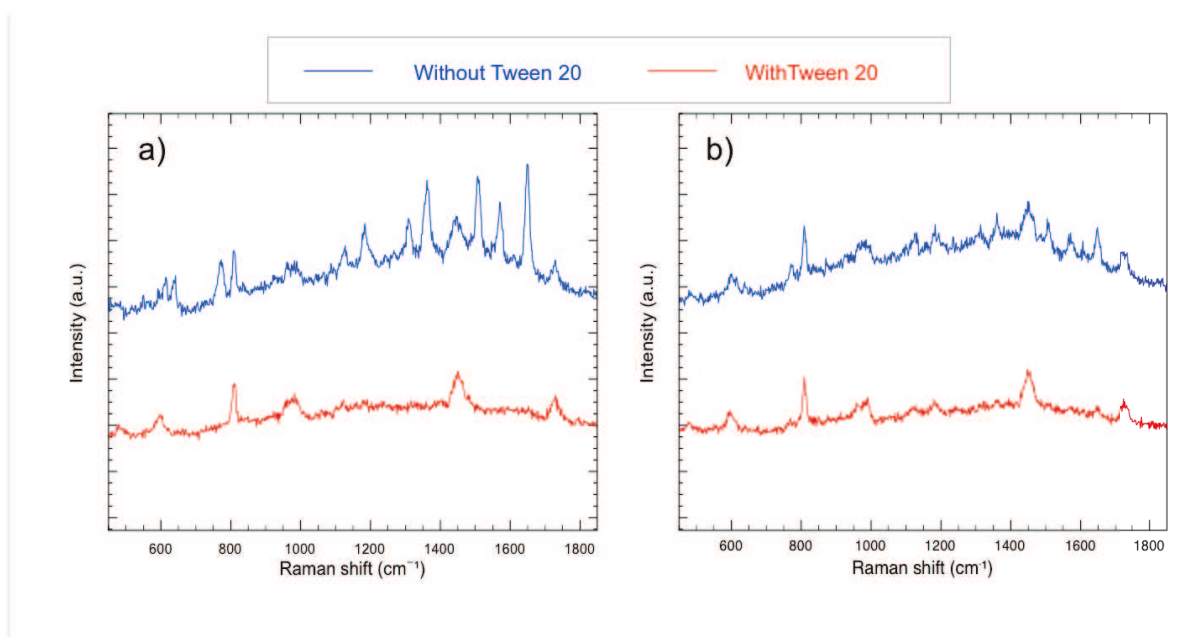


Figure III-2: Réduction de l'adsorption non-spécifique par ajout de Tween 20 dans les milieux d'hybridation et de lavage. a) Lavages en 4xSSC; b) Lavages en éthanol. Les spectres ont été acquis pour des échantillons de sonde Rup(R6G) seule. Durée d'acquisition : 1x10s

Quand l'hybridation, la fixation et le lavage sont réalisées dans un milieu simple de 4xSSC sans surfactant, on observe un très fort signal de R6G ; le pic à 1650 cm^{-1} est très marqué (**Figure III-2 a**). Cela indique une forte adsorption de la sonde de détection sur les billes magnétiques à fonction streptavidine. Quand l'étape de lavage est réalisée avec de l'éthanol au lieu de la solution saline 4xSSC (**Figure III-2 b**), on observe toujours un signal de R6G, mais son intensité est moindre. L'utilisation d'éthanol semble donc limiter l'adsorption non-spécifique de la sonde de détection sur les billes magnétiques.

L'ajout au milieu d'hybridation et de fixation du Tween 20 en concentration 0,05% induit une baisse d'intensité du signal de la R6G si on réalise l'étape de lavage avec une solution d'éthanol (**Figure III-2 b**). Le signal persiste toutefois. L'utilisation de Tween 20 combinée avec une solution saline de 4xSSC conduit à une disparition totale du signal de la R6G (**Figure III-2 a**) indiquant que l'adsorption non-spécifique de la sonde sur les billes magnétiques est totalement supprimée.

Nous avons testé ces conditions expérimentales sur des échantillons d'ADN simple brin de *R. rupicapra*. Des échantillons dépourvus d'ADN cible ont également été analysés comme contrôle négatif. Les spectres SERRS correspondant sont présentés en **Figure III-3**. On observe un fort signal de R6G en présence d'ADN cible (spectre a). Si l'ADN cible n'est pas présent dans l'échantillon de départ, le spectre SERRS (spectre b) ne présente aucun pic caractéristique de la R6G. On n'y observe que les pics caractéristiques de la cuvette en PMMA, annotés ici d'une étoile bleue. On a donc éliminé toute contribution d'adsorption non-spécifique de la sonde de détection durant les expériences d'hybridation-fixation-lavage-élution.

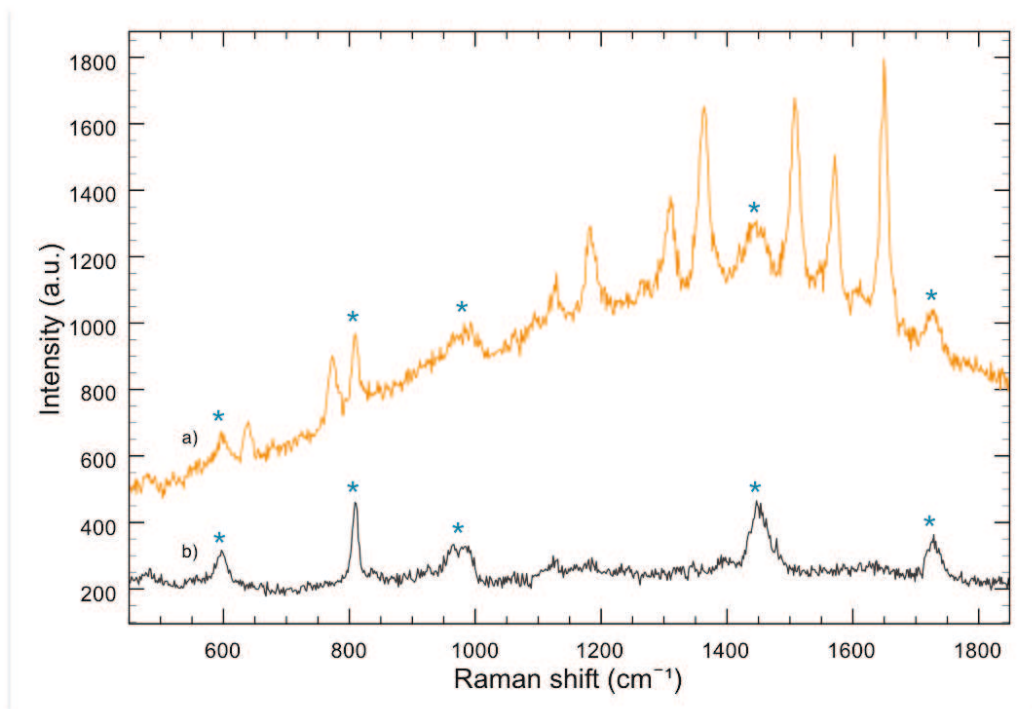


Figure III-3 : Spectres SERRS obtenus en utilisant le protocole optimisé incluant l'utilisation de Tween 20 ; a) ADN simple brin de *R. rupicapra*, concentration 1×10^{-7} M ; b) Témoin, pas d'ADN cible. Durée d'acquisition = 1×10 s.

IV.1.3. Elimination de l'hybridation non-spécifique

Une contribution parasite au signal SERRS peut provenir d'une **hybridation non-spécifique** de la sonde de détection à une séquence d'ADN non-cible. Or, la spécificité d'une hybridation est fortement influencée par la température, la salinité et le pH de la solution. On parle de **stringence** d'une solution, ou de sa capacité à influencer le processus d'hybridation des acides nucléiques. À fortes températures, faible salinité, la stringence est forte et maintenir une hybridation requiert une grande complémentarité des séquences ; les hybridations sont donc spécifiques. À faible température, forte salinité, la stringence est faible et les hybridations sont favorisées même si la complémentarité entre les brins est moins grande, menant ainsi à une contribution non-négligeable d'hybridations non-spécifiques.

Nous avons optimisé la spécificité en jouant sur la salinité des tampons, qui est le paramètre le plus facile à manipuler.

On agit uniquement sur la salinité du milieu de lavage. La **Figure III-4** présente les spectres SERRS obtenus pour des échantillons d'ADN non-cible (*Capra hircus*) en utilisant différentes salinités du milieu de lavage entre 4xSSC et 0.1xSSC. Tous contiennent du Tween 20, 0.05 wt%.

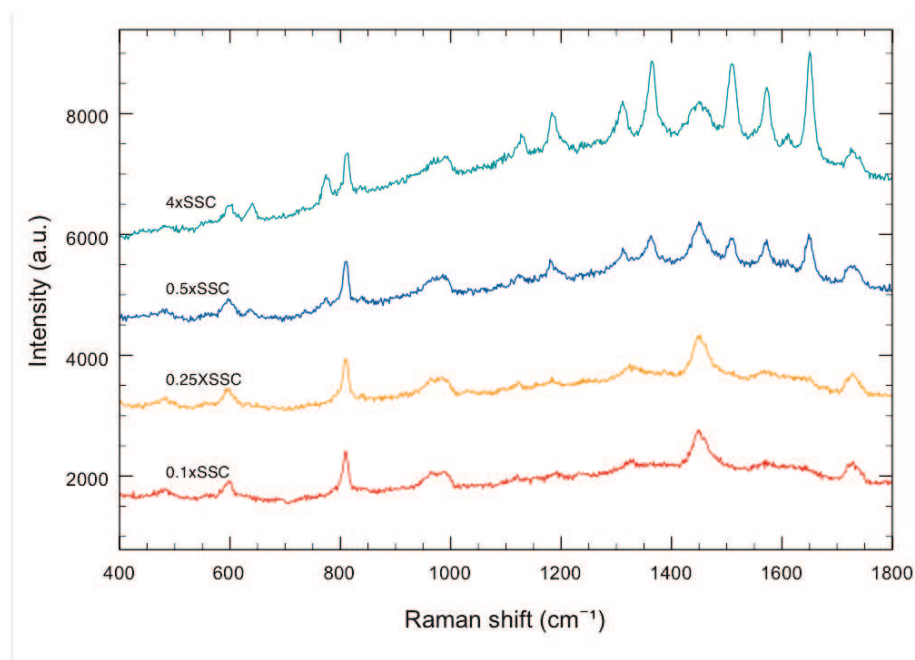


Figure III – 4 : Effet de la salinité du milieu de lavage sur l'hybridation non-spécifique. Les expériences ont été réalisées avec de l'ADN simple brin de *C. hircus* (5×10^{-8} M) en effectuant 2 étapes de lavage. Les salinités des milieux de lavages sont annotées au dessus des spectres. Durée d'acquisition = 1x30 sec ; Concentration en Tween 20 = 0.05%.

Quand le milieu de lavage est à la même salinité que le milieu d'hybridation-fixation, *i.e.* 4xSSC (spectre a), on observe très nettement les pics caractéristiques de la sonde de détection. Pourtant, il n'y a pas d'adsorption non-spécifique car le témoin ne présente aucun signal de R6G (spectre d). Cela indique une forte hybridation non-spécifique des sondes de capture et de détection à la séquence de *C. hircus* malgré les mismatches. La salinité des liquides de lavages a été progressivement abaissée. L'intensité du signal SERRS de la sonde de détection diminue lorsque l'on abaisse la salinité du milieu de lavage, indiquant que les sondes de

détection s'hybrident de moins en moins à l'ADN non-cible. À des salinités de 0.25xSSC et 0.1xSSC, on n'observe plus les pics caractéristiques de la R6G, ce qui indique une efficacité totale des étapes de lavages. Des échantillons d'ADN cible *R. rup.* analysés avec ces protocoles de lavages résultent en des signaux SERRS de R6G de même intensité. On peut donc réaliser les expériences avec l'une ou l'autre des salinités.

La méthode Hybridation-SERRS développée dans ce chapitre permet la détection spécifique et quantitative de séquences d'ADN simple brin. Elle est totalement non-enzymatique, et n'est donc pas limitée par les dégradations du substrat, ce qui élargirait considérablement la gamme d'échantillons analysables, notamment en paléogénétique. Nous avons ainsi fait un premier pas très prometteur vers la détection d'ADN naturel, moderne ou ancien. Toutefois, l'ADN d'un échantillon naturel, moderne ou ancien, est sous forme double-brin. Le chapitre suivant rapporte donc le développement d'une méthode de détection d'ADN double-brin.

Références bibliographiques

- Faulds, K., R. P. Barbagallo, et al. (2004). "SERRS as a more sensitive technique for the detection of labelled oligonucleotides compared to fluorescence." *Analyst* **129**(7): 567-568.
- Faulds, K., D. Graham, et al. (2004). "Evaluation of surface-enhanced resonance Raman scattering for quantitative DNA analysis." *Analytical Chemistry* **76**(2): 412-417.
- Galtier, N., M. Gouy, et al. (1996). "SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny." *Computer Applications in the Biosciences* **12**(6): 543-548.
- Gardner, S. (1984). *Principles of genetics*.
- Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, et al. (2004). "Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species." *Meat Science* **66**(3): 551-556.
- Gouy, M., S. Guindon, et al. (2010). "SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building." *Molecular Biology and Evolution* **27**(2): 221-224.
- Holmberg, A., A. Blomstergren, et al. (2005). "The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures." *Electrophoresis* **26**(3): 501-510.
- Pegels, N., I. Gonzalez, et al. (2011). "Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs." *Food Control* **22**(8): 1189-1196.
- Pinkel, D., J. Landegent, et al. (1988). "Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 9138-9142.
- Sabatte, G., R. Keir, et al. (2008). "Comparison of surface-enhanced resonance Raman scattering and fluorescence for detection of a labeled antibody." *Analytical Chemistry* **80**(7): 2351-2356.
- Vo-Dinh, T., K. Houck, et al. (1994). "Surface-enhanced Raman gene probes." *Analytical Chemistry* **66**(20): 3379-3383.

Chapitre 4

Détection spécifique d'ADN double-brin par hybridation-SERRS

L'ADN d'un échantillon naturel, moderne ou ancien, est sous forme double-brin. Pourtant, si plusieurs méthodes de détection SERRS ont été développées pour l'ADN simple-brin, il n'existe pas pour la détection d'ADN double-brin. Nous avons donc développé une méthode de détection spécifique d'ADN double-brin par hybridation-SERRS indépendante des voies classiques enzymatiques.

I. Introduction

Au regard des nombreuses méthodes qui permettent de détecter spécifiquement et sans enzymes de l'ADN simple-brin, telles que la fluorescence (Zhao, Tapeç-Dytioco et al. 2003), la détection scanométrique associée à un dépôt d'argent (Taton, Mirkin et al. 2000; Storhoff, Marla et al. 2004) ou la spectroscopie SERRS (Graham, Mallinder et al. 2002; Sun, Yu et al. 2007), le nombre de méthodes de détection d'ADN double-brin n'impliquant pas l'utilisation d'enzymes est incomparablement faible. En effet, la détection d'ADN double-brin présente un défi analytique supplémentaire dans la mesure où les brins complémentaires de la molécule cible se réhybrident très rapidement après dénaturation en raison de leur très forte affinité l'un pour l'autre. À notre connaissance, une seule et unique méthode non-enzymatique de détection d'ADN double-brin est décrite dans la littérature. Hill et al. (2007) proposent une méthode reposant sur l'hybridation de la molécule cible double-brin avec des particules d'or fonctionnalisées, couplée à une détection scanométrique après dépôt d'argent (**Figure IV-1**). La réhybridation des brins complémentaires de la molécule cible est bloquée par de courts oligonucléotides spécifiques introduits en excès dans le système. Les « bloqueurs » s'hybrident à l'un des deux brins, laissant le second disponible pour une hybridation avec les

sondes de détection. La procédure élaborée par Hill et al. (2007) nécessite de multiples et longues étapes, qui durent environ 7h. De plus, la fonctionnalisation préalable des particules magnétiques et des particules d'or demande au moins 12h.

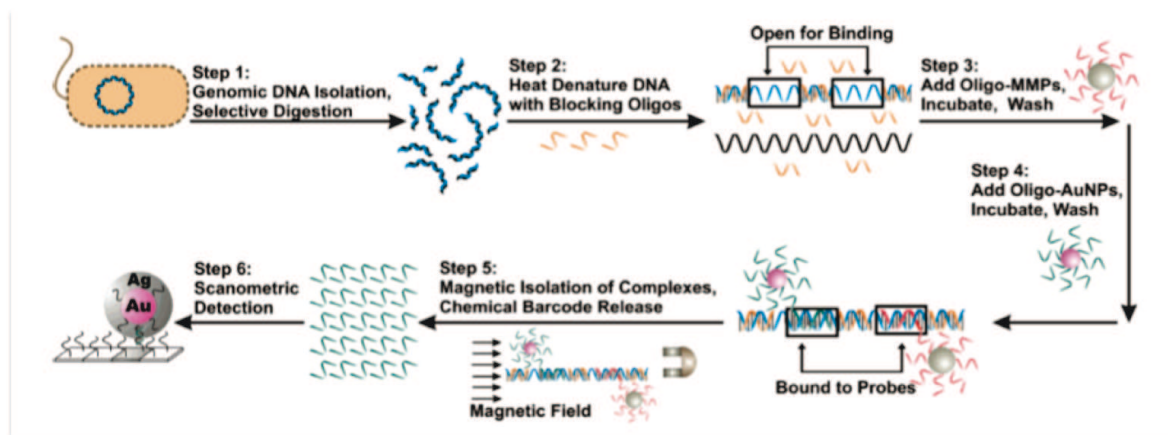


Figure IV-1: Principe de détection non-enzymatique d'ADN double-brin utilisé par Hill et al. (2007)

En complément de la méthode de Hill et al. (2007), nous proposons d'appliquer la spectroscopie SERRS à la détection d'ADN double-brin, en développant une méthode de détection rapide et simple par hybridation. Comme pour la détection d'ADN simple-brin, notre méthode repose sur l'hybridation de deux sondes spécifiques à la molécule d'ADN cible, une sonde de capture et une sonde de détection SERRS. Nous ajoutons également des oligonucléotides bloqueurs afin d'empêcher la réhybridation des brins complémentaires de la molécule d'ADN cible.

Nous profitons également des avantages du SERRS pour le multiplexing, ou la détection simultanée de différentes séquences d'ADN. En effet, en plus de limites de détection meilleures que celles de la fluorescence, les spectres SERRS présentent des pics fins qui sont plus facilement distingués les uns des autres, même sur un spectre complexe (Graham, Mallinder et al. 2002; Docherty, Smith et al. 2004; Faulds, McKenzie et al. 2007; Faulds, Jarvis et al. 2008). De plus, une multitude de molécules peut servir de marqueur SERRS ; les

plus utilisées pour l'analyse d'acides nucléiques, ainsi que leurs caractéristiques spectroscopiques sont listées par Graham et Faulds (2008). Jusqu'à 6 oligonucléotides marqués différents ont pu être détectés simultanément (Faulds, Jarvis et al. 2008). Ainsi, il est possible de détecter plusieurs séquences de façon spécifique, et donc potentiellement plusieurs espèces. Afin de discriminer deux espèces, nous avons choisi les marqueurs R6G et HEX, qui présentent des limites de détection du même ordre de grandeur et des longueurs d'onde d'absorption maximale proches, de 535 et 524 nm, respectivement (Docherty, Smith et al. 2004).

Notre méthode de détection d'ADN double-brin a été testée sur d'ADN deux séquences cibles courtes, de 92 et 91 paires de bases, correspondant à des séquences d'ADN mitochondrial de *R. rupicapra* et *C. hircus*, respectivement. Comme nous l'avons vu en introduction, après la mort d'un organisme, l'ADN subit des dégradations, dont la plus importante est la fragmentation. Il est rare de trouver des séquences d'ADN ancien excédant 200 paires de bases (Paabo 1989). Les méthodes de détection d'ADN « fossile » doivent donc cibler de courtes séquences. Pour des séquences aussi courtes, nous avons mis en place un système de détection impliquant un **unique bloqueur**, permettant d'empêcher la réhybridation de la molécule d'ADN cible.

II. Détection non-enzymatique d'ADN double-brin par Hybridation-SERRS

Ce travail a été publié dans *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Résumé :

Nous avons développé une méthode de détection spécifique d'ADN double-brin, en combinant hybridation moléculaire et spectroscopie SERRS (Surface Enhanced Resonant Raman Scattering). Les méthodes classiques de détection d'ADN, de la PCR aux séquençages de nouvelle génération reposent sur l'utilisation d'enzymes ; la méthode développée dans

cette étude a la particularité d'être totalement non-enzymatique. En effet, l'efficacité des processus enzymatiques est influencée par la qualité de l'ADN analysé, ses altérations et modifications chimiques. Par exemple, une des limitations des ADN-polymérases est leur incapacité à traiter des molécules d'ADN endommagées par des lésions bloquantes telles que les sites abasiques ou les pyrimidines oxydées. Par conséquent, l'amplification et le séquençage enzymatique de molécules d'ADN dégradé se soldent souvent par un échec.

Nous avons détecté et quantifié avec succès les proportions relatives dans un mélange de deux séquences d'ADN double-brin très proches, provenant des espèces *Rupicapra rupicapra* (chamois) et *Capra hircus* (chèvre). La méthode de détection par SERRS présentée dans cette étude est donc une approche non-enzymatique très prometteuse pour parer à la défaillance de l'ADN polymérase lorsque l'ADN est trop dégradé ou lorsque des inhibiteurs de l'ADN polymérase sont présents en trop forte concentration. C'est la première fois à notre connaissance que de l'ADN double-brin est détecté selon une méthode non-enzymatique basée sur une détection SERRS. Ce moyen de détection d'ADN non-enzymatique, rapide et peu coûteux, représente donc une avancée majeure dans le domaine de la détection des acides nucléiques.

Dans la version de soutenance de cette thèse, les pages 114-121 permettent la lecture de l'article :

« Enzyme-free detection and quantification of double-stranded nucleic acids », **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 2012, Volume 404, N° 2, 415-422, DOI:10.1007/s00216-012-6133-1

Pour des raisons de respect du copyright, la version publiée de cet article ne peut être reproduite et diffusée ici. Elle est consultable à l'adresse suivante :

<http://www.springerlink.com/content/159v727lu022806g/>

Références bibliographiques

- Docherty, F. T., W. E. Smith, et al. (2004). "The first SERRS multiplexing from labelled oligonucleotides in a microfluidics lab-on-a-chip." Chemical Communications(1): 118-119.
- Faulds, K., R. Jarvis, et al. (2008). "Multiplexed detection of six labelled oligonucleotides using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS)." Analyst **133**(11): 1505-1512.
- Faulds, K., F. McKenzie, et al. (2007). "Quantitative simultaneous multianalyte detection of DNA by dual-wavelength surface-enhanced resonance Raman scattering." Angewandte Chemie-International Edition **46**(11): 1829-1831.
- Graham, D. and K. Faulds (2008). "Quantitative SERRS for DNA sequence analysis." Chemical Society Reviews **37**(5): 1042-1051.
- Graham, D., B. J. Mallinder, et al. (2002). "Simple multiplex genotyping by surface-enhanced resonance Raman scattering." Analytical Chemistry **74**(5): 1069-+.
- Hill, H. D., C. A. Mirkin, et al. (2007). "Nonenzymatic detection of bacterial genomic DNA using the bio bar code assay." Analytical Chemistry **79**(23): 9218-9223.
- Paabo, S. (1989). "Ancient DNA - Extraction, Characterization, Molecular-Cloning, and Enzymatic Amplification." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(6): 1939-1943.
- Storhoff, J. J., S. S. Marla, et al. (2004). "Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system." Biosensors & Bioelectronics **19**(8): 875-883.
- Sun, L., C. X. Yu, et al. (2007). "Surface-enhanced raman scattering based nonfluorescent probe for multiplex DNA detection." Analytical Chemistry **79**(11): 3981-3988.
- Taton, T. A., C. A. Mirkin, et al. (2000). "Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes." Science **289**(5485): 1757-1760.
- Zhao, X. J., R. Tapeç-Dytioco, et al. (2003). "Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles." Journal of the American Chemical Society **125**(38): 11474-11475.

Chapitre 5

Comparaison Hybridation-SERRS / PCR pour la détection d'ADN double-brin dégradé

I. Introduction

La méthode de détection d'ADN développée au cours de cette thèse permet de détecter spécifiquement et de quantifier des séquences d'ADN simple- et double-brin. À ce jour elle n'a été encore appliquée qu'à des séquences synthétiques idéales, et sa capacité à détecter de l'ADN altéré en milieu naturel reste à démontrer. Nous proposons d'étudier dans un premier lieu des molécules d'ADN synthétiques contenant des lésions bloquant les procédures d'amplification enzymatique afin de prouver les capacités de la méthode Hybridation-SERRS. Une lésion bloquante propice à l'étude est le site abasique, dont des analogues synthétiques tels que le tétrahydrofurane sont commercialisés (Takeshita, Chang et al. 1987) et peuvent être incorporés dans les oligonucléotides au moment de leur synthèse (Eurogentec). De plus, les sites abasiques sont une lésion bloquante très courante (Zhou and Doetsch 1993). La présence d'un site abasique peut réduire l'efficacité d'une amplification par PCR de 98% (Shibutani, Takeshita et al. 1997; Sikorsky, Primerano et al. 2007). Aussi des méthodes de réparation enzymatique des sites abasiques ont-elles été proposées. Briggs et al. (2010) utilisent par exemple l'endonucléase VIII pour cliver les molécules d'ADN au niveau des sites abasiques.

Cependant, les procédures de réparation enzymatiques ne peuvent s'utiliser qu'à l'aveugle. Il n'existe aucun moyen de connaître le contenu en ADN d'un échantillon, en particulier dans le domaine de la paléogénétique. Une absence d'amplification par PCR n'indique pas obligatoirement que l'échantillon ne contient pas d'ADN. Le degré et la nature des altérations subies par les molécules d'ADN les rendent peut-être inaccessibles par traitement par ADN-

polymérase. Effectuer les étapes de réparation enzymatiques systématiquement avant PCR représente une approche très coûteuse pour des résultats incertains, car il n'est pas possible de prévoir le type de dégradation subi par un échantillon. La méthode Hybridation-SERRS pourrait être utilisée comme premier test rapide et peu onéreux, afin de savoir si l'échantillon contient effectivement de l'ADN d'intérêt et en quelle quantité. S'il en contient, les procédures longues de la réparation enzymatique seront tentées. S'il n'en contient pas ou trop peu, les chercheurs n'auront perdu que 2 heures de leur temps et peu de moyens financiers.

Nous avons d'une part étudié l'impact de la présence de sites abasiques sur l'efficacité de la méthode SERRS-hybridation, et d'autre part comparé les performances de notre méthode par rapport à une réaction de PCR classique. Onze molécules d'ADN double-brin ont été étudiées, contenant des sites abasiques en nombres et positions variées.

II. Analyse d'ADN altéré par la méthode Hybridation-SERRS et comparaison avec la PCR

Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation.

Résumé en français :

Pour identifier l'espèce d'origine d'une vaste gamme d'échantillons (os, dent, sang, produit alimentaire), des technologies moléculaires telles que la PCR (Polymerase Chain Reaction) ou le séquençage sont couramment utilisées. Les dégradations trouvées dans l'ADN extrait de substrats anciens ou traités mènent souvent à un échec de l'amplification par PCR, entraînant les recherches en ADN ancien ou dégradé dans une impasse. Parmi les nombreuses lésions subies par la molécule d'ADN, il est prouvé que les sites abasiques bloquent l'élongation par les ADN-polymérases. Dans cette étude, nous détectons par une méthode non-enzymatique de l'ADN réfractaire à l'amplification par PCR. Cette méthode, basée sur l'hybridation et la détection par SERRS (Surface Enhanced Resonant Raman Scattering) a permis la détection d'une gamme de 11 molécules d'ADN double-brin altéré par des sites abasiques sur les 2

brins en nombre varié. L'amplification par PCR n'a pas permis la détection des molécules les plus dégradées. Ainsi, des molécules d'ADN ne pouvant pas être analysées par PCR ont pu être détectées rapidement, sans procédure de réparation. Ceci confère à la méthode SERRS-hybridation un très fort potentiel en tant que méthode de détection non-enzymatique alternative, en particulier pour les substrats anciens ou traités.

A SERRS-hybridization assay for the detection of DNA sequences refractory to PCR amplification

Cécile Feuillie^{# 1}, Maxime Mohamad Merheb^{# 2}, Benjamin Gillet³, Gilles Montagnac¹, Isabelle Daniel¹ and Catherine Hänni²

Co-first author

1: Laboratoire de Géologie de Lyon - Terre Planètes Environnement, UMR 5276, ENS de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

2: Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, UMR 5242, Université Lyon 1, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

3: Plateforme nationale de Paléogénétique PALGENE, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Abstract

Molecular technologies based on DNA markers are currently used to identify bacterial, plant and animal species in a very large number of fields from the fundamental research to industrial applications, including phylogeny, paleogenetics, quality control and medical diagnosis. Some of these fields focus on the study of DNA molecules that are altered, chemically modified and in tiny amounts. Degradation of DNA extracted from ancient or processed substrates such as teeth, bone, hair and food often leads to the failure of the Polymerase Chain Reaction (PCR) causing a dead end in ancient and degraded DNA research. Among numerous DNA lesions, abasic sites are well known to stop the elongation by DNA-polymerases. Here we apply a non-enzymatic method to the

detection of DNA refractory to PCR amplification. This method combines specific hybridization with detection by Surface Enhanced Resonant Raman Scattering (SERRS). It allows the detection of a series of double-stranded DNA molecules containing varying numbers of abasic sites on both strands, when PCR failed to detect the most degraded sequences. Our SERRS approach can quickly detect DNA molecules without any need for DNA repair. This gives the present SERRS hybridization assay the potential to be an alternative non-enzymatic DNA detection method, especially for ancient or processed substrates.

Introduction

Identification of bacterial, plant and animal species from DNA in a wide variety of substrates is a great challenge, not only in fundamental research but also in industry. It has benefited from the development of sensitive molecular tools. In particular, the Polymerase Chain Reaction (PCR), an *in vitro* enzymatic DNA amplification technique, allows the retrieval and identification of minute amount of DNA from most substrates, even from ancient or processed ones (1). Moreover, the development of extraction methods that not only optimize retrieval and purification of DNA but also remove PCR inhibitors has additionally contributed to optimizing the quality of extracted DNA and subsequently facilitating DNA analysis of challenging samples (2, 3). Recently Next Generation Sequencing (4) methods improved the retrieval of DNA sequences, and enabled both large-scale sequencing (5-7) and whole genome sequencing (8-10).

However the amount of chemical alteration is still a limitation for the investigation of ancient and degraded DNA (11), because DNA undergoes severe modification after death (12). On the one hand, lesions like cytosine desamination lead to mispairing during amplification or sequencing, and thus result in miscoding errors. On the other hand, several types of DNA

damage such as oxidized pyrimidines (11, 13), cross-links (11, 13, 14) and abasic sites in DNA substrates (13-20) are known to block the bypass of polymerases and are therefore referred to as blocking lesions. As a consequence, the usually powerful methods of enzymatic amplification or sequencing, which both rely on the use of DNA-polymerases frequently fail with ancient or processed substrates because of their high degradation level (11, 15, 16, 21). This difficulty can sometimes be overcome by using reparative techniques. For instance, Briggs et al. (19) proposed the combination of the Uracil-N-Glycosylase and the Endonuclease VIII both to remove the Uracil residues and eliminate the resulting abasic sites. Nevertheless, there is often no direct way to check for the presence of target DNA prior to the repair procedures that are expensive and time-consuming. Another advance involves the development of new polymerases that can bypass lesions such as the abasic sites and the hydantoins (22, 23). Unfortunately the latter damage-tolerant polymerases are not necessarily more efficient than the classical ones, and sometimes show a lower fidelity in particular for ancient DNA (11, 22). The development of a truly non-enzymatic DNA detection method would therefore be highly advantageous for the quick detection of DNA refractory to PCR.

Non-enzymatic methods of detection already exist for single-stranded DNA, using for instance fluorescence (24), scanometric detection combined to silver enhancement (25, 26) and Surface Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS). Among these, SERRS offers a great multiplexing capacity (27-29) and a better sensitivity than fluorescence (30) that could be the key to providing an alternative to PCR amplification. Whilst SERRS has been used for the detection of single-stranded DNA since 1997 (31-34), it has only recently been successfully developed for the detection of double-stranded DNA in a SERRS-hybridization assay (29). This assay, independent of enzymes, should therefore not be impeded by the presence of blocking lesions or PCR inhibitors, and has the potential to detect degraded DNA. Here we prove the detection of double-stranded degraded DNA refractory to PCR thanks to

the SERRS-hybridization assay. Among the variety of blocking lesions we selected abasic sites since they occur very frequently after exposure to radiation or chemical degradation (35). The presence of abasic sites in DNA reduces both the efficiency and the fidelity of *Taq* polymerase, leading to deletions and mis-incorporations (15, 16, 36). Here we studied a series of synthetic double-stranded DNA molecules that contain analogs of abasic sites, and conducted parallel analyses of these molecules by a classical PCR reaction and by the SERRS-hybridization assay. The latter allowed us to detect all molecules, whereas PCR failed to detect the most degraded ones.

Results and discussion

- Target DNA nomenclature

The composition of the synthetic DNA molecules used in this study including the location of abasic sites is presented in Table 1. Four molecules oriented 5' to 3' contain either no abasic site, 1 abasic site at position 74, 2 abasic sites at positions 64 and 74, or 5 abasic sites at positions 45, 54, 63, 72 and 81, respectively. The complementary 3' to 5' strands carry either no abasic site, 1 abasic site at position 48 or 4 abasic sites at positions 49, 58, 67 and 76, respectively. Hereafter the molecules analyzed in this study are labeled according to their content of abasic sites written as a roman numeral (R) from I to V. All molecules are therefore named in the form $R_{5'}/R_{3'}$, where $R_{5'}$ and $R_{3'}$ represent the 5'-3' and the 3'-5' strand, respectively. N stands for no abasic sites and indicates that the strand is non-degraded. Eleven combinations of double-stranded DNA were analyzed in this study and are listed in Table 2.

- PCR amplification of altered DNA

The eleven molecules (Table 2) were used as templates for PCR amplification and the appropriate blank controls were performed to monitor possible DNA contamination that can occur during PCR set-up. Primers were designed to amplify a fragment of 134 bp of mitochondrial DNA of *Rupicapra rupicapra* (12S rRNA gene). For each molecule, 4

independent PCR reactions (PCR1, PCR2, PCR3 and PCR4 in Suppl. Data) were achieved and PCR products were separated by high-resolution gel electrophoresis. The resulting gels are displayed in Figure 1. PCR products were also cloned into a bacterial vector and subsequently sequenced. They were finally screened for miscoding and deletions. The alignment of the sequences obtained for N₅/N₃, I₅/I₃ and V₅/IV₃ are displayed in Tables 3, 4 and 5, respectively. All data are available in the Supplementary materials.

No PCR amplification event was observed in blank controls (Figure 1) indicating the absence of DNA contamination. PCR results of molecules that bear one N₅ and/or N₃ non-degraded strand reveal specific and intense bands of the expected size 134 bp on the gel electrophoresis without low molecular weight DNA amplification (no DNA smear and/or primer dimers) (Figure 1). First, nineteen sequences were obtained for non-degraded N₅/N₃ molecule (Table 3) and thoroughly analyzed: 10/19 of them are perfect copies of the reference N molecule, 8/19 display a single deletion and only 1/19 displays a multiple deletion of 6 bases. Among the one-base shorter molecules, four sequences display a single-base deletion at position 65 (Table 3), which suggests they are not randomly located. Three sequences display a single deletion at positions 97, 77 and 45, and one molecule displays a single deletion at position 45 and an undetermined base at position 44. The one-base shorter molecules reflect the classical errors occurring during the synthesis of oligonucleotides. Indeed, although the synthesis procedure leads to a majority of the expected molecules, it also leads to a few molecules with one missing base, which cannot be eliminated by PAGE purification (Eurogentec, supplier communication). Second, for the molecules with one native strand N₅ or N₃ (*i.e.* N₅/I₃, II₅/N₃, N₅/IV₃ and V₅/N₃, see Supplementary material), the reference N sequence is the most abundant among the PCR products with 15/27, 16/27, 12/22 and 12/27 of the sequences obtained, respectively. The other sequences present short scale deletions from 1 to 17 bases and the average percentage of miscoding errors is 2.3 times larger than for the non-degraded

molecule (Figure 2). The deletions and miscoding errors are often located at or close to the position of the initial abasic sites (Suppl. Data).

PCR results of molecules with two degraded strands are characterized by a further increase of the miscoding error percentage, combined with a decrease of the average length of the sequences obtained (Figure 2). The sequencing results reveal that the original molecule is no longer present in the amplicons (Table 4; Suppl. Data). The miscoding error reaches an average of 0.36%, which is more than twice that obtained for molecules with one original N-strand (Figure 2). These miscoding errors cannot originate only in the *Taq*-polymerase error rate of 2.6×10^{-5} (37) and therefore must originate in the altered parts of the DNA template. The analysis of the deletion content allows distinguishing between two groups of molecules. First, the molecules I_5/I_3 , II_5/I_3 , I_5/IV_3 and V_5/I_3 present PCR products of a mean size close to the expected one and display a weak DNA smear (Figure 1). The sequences obtained are on average 10 bases shorter than the expected sequence (Figure 2). Second, the most degraded molecules II_5/IV_3 et V_5/IV_3 reveal no specific PCR amplification at or close to the expected size, exhibiting only a DNA smear (Figure 1). The sequences obtained display large-scale deletions (Tables 5; Suppl. Data), and their average length are 45 and 59 bases shorter than expected for the II_5/IV_3 and V_5/IV_3 molecules, respectively (Figure 2). Practically, these two most degraded molecules cannot be specifically detected by PCR amplification and the specific expected sequence cannot be deduced from the PCR products, as they bear too many large deletions (Tables 5). This shows that a sample rich in DNA may not lead to a successful PCR amplification due to the alteration of the DNA template. The failure of PCR on such a model synthetic substrate emphasizes the need for an alternate non-enzymatic DNA detection method, such as the SERRS-hybridization assay proposed in this study.

The deleted areas in the PCR products are clearly located at or nearby the original abasic sites (Tables 4 and 5; Suppl. Data). The PCR product echoes the initial template, and the position

of the deletions in the PCR products therefore allows determining which strand of the original molecule was used as template. This brings to light a bias in the PCR amplification due to the primers. Indeed the PCR primer Rup_For_{5'} is obviously favored during PCR, resulting in a more intense amplification of the R_{3'} strand compared to the R_{5'}. The PCR and sequencing results of the I_{5'}/I_{3'} molecule are a good example (Table 4). The original I_{5'}/I_{3'} molecule displays one abasic site at position 74th on the 5'-3' strand, and one abasic site at the position 48th on the 3'-5' strand (Table 1). Sequences obtained from PCR of this template exhibit deletions or miscoding errors either around the 48th position (19/25) like PCR event n°15 or the 74th position (4/25) like PCR event n°3 (Table 4). This shows that the amplification of the I_{3'} strand is clearly favored. A similar trend is observed for all molecules carrying both degraded strands (Suppl. Data). Lastly PCR event n°9, corresponding to 1/25 of the sequences, exhibits deletions around both the 48th and 74th positions. This shows evidence of jumping PCR, where a chimeric molecule is created using more than one template (Table 4). Here, both strands of the initial DNA molecule were used and the amplification product therefore bears both modifications.

- *Principle of the SERRS-hybridization assay*

The principle of the SERRS-hybridization assay is summarized in Figure 3 (29). We took advantage of the great versatility of the SERRS-hybridization assay developed for the detection of double-stranded DNA and optimized it for the detection of a 139 bp DNA sequence of mitochondrial DNA (12S rRNA) of *Rupicapra rupicapra* (Chamois). After denaturation of double-stranded DNA target, one strand hybridizes to both a capture probe and a detection probe. The capture probe is a biotinylated oligonucleotide that hybridizes to the strand at the 5' end and allows the immobilization of the complex on streptavidin coated magnetic microbeads. The detection probe is a Rhodamine-6G (R6G) labeled oligonucleotide, which hybridizes at its 3' end and is detected by SERRS. Using small oligonucleotides of 30,

29 and 31 bases, called blockers, circumvents the rapid rehybridization of the target DNA to its complementary strand. The three blockers are added 10^3 times in excess compared to target DNA concentration and fully prevent rehybridization, thus leaving the target strand available for hybridization with the probes. After this first step, all unbound compounds are washed off and the detection probes are recovered after a thermal dissociation step. They are subsequently detected by SERRS. The whole analysis is completed in 2 hours.

- *Detection of DNA by SERRS*

The eleven molecules ranging from no abasic sites in the original sequence to 9 abasic sites distributed on both strands were investigated by the SERRS hybridization assay. Results of detection by the SERRS-hybridization assay are displayed in Figure 4.

As a prerequisite, we verified that the system of three blockers was completely hindering the rehybridization of both complementary strands by comparing the SERRS results obtained for double-stranded and for the single-stranded original sequence. The SERRS signals obtained at the same concentration have similar intensities (Figure 4), which indicates that the blocking system is highly efficient. The blocking system was also challenged by the molecules N_5'/IV_3' , I_5'/IV_3' , II_5'/IV_3' . The IV_3' complementary strand presents three abasic sites towards the middle blocker, whose specificity towards target DNA is compromised. When analyzed by the SERRS-hybridization assay, these three DNA molecules are detected without any loss of signal compared to the N_5'/N_3' molecule despite the abasic sites located in the hybridization area of the blocker (Figure 4). This indicates that the system of three blockers allows a full access to the target strand, even when the hybridization of one of them may not be guaranteed.

The analyses of the degraded molecules by the SERRS-hybridization assay all lead to a strong SERRS signal from the R6G probe, with an amplitude commensurate with the signal of the original N_5'/N_3' sequence (Figure 4). Regardless of their respective degradations, all degraded

molecules are detected by the SERRS-hybridization assay, even the two most degraded ones that PCR failed to amplify and detect. The SERRS spectra obtained for negative controls void of DNA do not display any R6G characteristic signal, thus ruling out non-specific hybridization or adsorption. The present SERRS measurements show therefore that the SERRS-hybridization assay can actually detect the presence of a specific target DNA sequence, even when degraded and refractory to PCR.

Although the SERRS signals obtained for the molecules N_5/I_3 , II_5/N_3 , N_5/IV_3 , I_5/I_3 , II_5/I_3 , I_5/IV_3 and II_5/IV_3 are the same intensity as the non-degraded molecule N_5/N_3 , the molecules containing the V_5 target strand with 5 abasic sites, *i. e.* V_5/N_3 , V_5/I_3 and V_5/IV_3 , show a SERRS signal with a slightly lower intensity. The SERRS signal clearly indicates the presence of the targeted molecule despite the degradations, but the signal is 23 to 34% lower than for the other molecules probably because the V_5 target strand is the only one that has two abasic sites in the capture probe hybridization area (Table 1). The capture process can therefore be challenged, and lead to a less efficient immobilization of target molecules. Some target DNA might be left “uncaught” in the sample, or lost during the washing step, as the specificity of the capture probe hybridization could be slightly decreased.

The SERRS-hybridization assay allows the detection of the whole range of degraded molecules. Though a slight loss of signal is observed when five abasic sites are present on the target strand, the obtained SERRS signal are comparable to those obtained for the non-degraded molecule, even for the molecules that could not be detected by the classic PCR reaction. To the best of our knowledge, this is the first time that degraded DNA that was not suitable for routine analysis like PCR was directly detected without DNA repair. The biophysical approach conducted in this study is therefore a very powerful non-enzymatic DNA detection method – one that provides an alternative to enzyme-based DNA detection tools such as PCR.

Conclusion

In the present study, we have succeeded in detecting altered DNA molecules that PCR failed to detect. This is the first time that DNA refractory to PCR can be directly detected without any repair process. Through a fully non-enzymatic method based on molecular hybridization and SERRS detection we achieved the detection of a range of double-stranded DNA molecules containing between 0 and 9 abasic sites distributed on both strands. Although the target DNA concentration was high, the *Taq* polymerase could not correctly bypass the lesions, leading to small-scale deletions and miscoding incorporations or to a complete failure of amplification for the most degraded molecules. The analysis of the same molecules by the SERRS-hybridization assay lead to the detection of the whole range of degraded molecules with SERRS signal intensities comparable to those observed for the authentic non-degraded molecules. We have therefore proven that this SERRS-hybridization assay has the potential to provide an alternative to PCR. Samples could be quickly tested for the presence of a specific double-stranded target DNA before getting involved in long and expensive trials of DNA purification and repair. This could be particularly useful in the case of ancient DNA, where there is no way to assess the amount of DNA present in a sample prior to enzymatic procedures. Moreover, given the multiplexing capacity of the SERRS-hybridization assay, multiple DNA targets could be screened in one trial (29) even when highly degraded. The biophysical approach used in the SERRS-hybridization assay enables access to a new range of samples that were not suitable for PCR analysis because of high degradation. The SERRS-hybridization assay can also be valuable as an enrichment method of a particular DNA of interest prior to more thorough investigation. Many applications for this assay could exist in research areas such as medical diagnosis. Additionally, the environmental sciences, ecology, forensics and paleogenetics, where DNA is often degraded and co-extracted with polymerase inhibitors, will directly benefit from the use of this assay. Finally, though degradation content

is not directly correlated to the age of a DNA sample, the SERRS-hybridization assay could help in the search for older DNA biosignatures.

Material and Methods

Reagents

All reagents were analytical grade. Tetrahydrochloride spermine (Fluka, #85610), Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween20, #P1379) and silver nitrate 99.999% (#S8157) were purchased from Sigma-Aldrich®. 1% trisodium citrate (#S1804) was from Fisher®. Ultra pure™ 20xSSC Buffer (Gibco, #15557-044), Streptavidin-coated magnetic microbeads (Dyna®), Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, #650-02, 10 mg.ml⁻¹, 2ml, 7-12x10⁹ beads) and the matching DynaMag™-2 magnetic separator (Dyna®, #123-21D) were purchased from Life Technologies™.

Target DNA sequences

We studied 11 double-stranded DNA molecules with varying degradation rates. The non-degraded molecule is a 139 bp sequence of mitochondrial DNA (12S rRNA gene) of *Rupicapra rupicapra* (Chamois). Chemically synthesised abasic sites were regularly added on both strands, from 0 to 5 on the 3'-5' strand and from 0 to 4 on the 5'-3' strand. The analog of abasic sites used is Tetrahydrofuran (THF). Complementary strands of DNA targets were specifically hybridized prior to the experiment. 50 µl of a solution of each complementary strand at a concentration of 2.10⁻⁷ M were mixed, and allowed to stand at room temperature for at least 60 h, yielding a solution of double-stranded DNA at a concentration of 10⁻⁷ M. Concentration was adjusted according to the manufacturer's instruction.

All target DNA sequences are listed in Table 1.

PCR assay

- *Primer design*

PCR primers of 21 and 18 bases, Rup_For_{5'} and Rup_Rev_{3'} respectively, were designed to

amplify specifically a fragment of 134 bases of mitochondrial 12S rRNA gene of *Rupicapra rupicapra* (Chamois). Primers are listed in Table 1 and were purchased from Eurogentec®.

- *PCR conditions*

PCR reaction was carried out in a total volume of 25 µl. For one reaction, PCR conditions were as follows: 0.5 µl of Taq Gold polymerase (5U/µl, Applied-Biosystems®), 2.5 µl of 10X Gold buffer, 2.5 µl of MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl of each primer Rup_For_{5'} and Rup_Rev_{3'} (25 µM), 0.25 µl of dNTP (100 µM) and 1.5 µl of DNA target (5x10⁻⁸ M). The following thermal cycling program was conducted: an initial activation of hot-start DNA Polymerase at 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s, with a final extension step at 72°C for 7 min. Five µl of PCR products were visualised on high-resolution 2% agarose / 4% NuSieve® agarose gels using ethidium bromide staining and UV light transillumination. We used the SmartSF ladder (Eurogentec #MW-1800-04).

Cloning and sequencing

PCR products were cloned into bacterial vectors using TOPO TA cloning for sequencing kit® (Life Technologies™, #K457540) according to the manufacturers instructions. Screen for plasmid inserts was directly conducted from *E. coli* colonies using PCR amplification. PCR reaction was carried out in a total volume of 20 µl. PCR conditions were as follows: 8 µl of Master Mix (5 Prime), 0.25 µl of each M13 Rev1 and M13 For1 primers (10 µM) and 11.5 µl of sterile water. M13 Rev1 (5'-GTTTCCAGTCACGACGTTG-3') and M13 For1 (5'-TTTCACACAGGAAACAGCTAT-3') primers flank the cloning site. For each cloned amplicon, 8 bacterial colonies were tooth-picked into PCR reaction mix and were screened by PCR as described hereafter: an initial step to burst bacterial cells at 95°C for 30 s, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C

for 45 s, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were separated in 2% agarose gels, screened for positive insertion and sequenced by Beckman Genomics®.

Data processing

After removing the vector, sequences were aligned manually using the Seaview software (38) and thoroughly investigated.

SERRS hybridization assay

- *Oligonucleotide probes*

A SERRS 22-mer oligonucleotide labeled with one molecule of Rhodamine 6G (detection probe), a biotin labeled 21-mer oligonucleotide (capture probe) and 3 blocker oligonucleotides (29 to 31 bases) were purchased from Eurogentec®. The 21-mer biotin probe is modified with 3'-biotin that is linked to the oligonucleotide via the 9-atom spacer triethylene glycol. The 22-mer R6G-probe is modified with 5'-Rhodamine 6G (R6G), which is linked to the oligonucleotide via a C6 spacer. All DNA sequences used in this study are listed in Table 1.

- *Hybridization*

Hybridization was performed in a single step. 10 µl of target DNA solution were mixed with 10 µl of the capture probe (10 µM), 10 µl of each detection probe (10 µM) and 10 µl of each blocking oligonucleotide (10^3 times in excess compared to target DNA concentration). The blockers were initially prepared in 4xSSC, Tween 20 (0.5%). The resulting solution was heated to 95°C for 2 min to ensure denaturation of double-stranded DNA target, potential hairpins or autohybridized DNA. Hybridization was achieved in a thermocycler by lowering the temperature from 55°C to 25°C at a rate of 1°C per min.

- *Immobilization*

Series of 25 µl of the stock solution of magnetic microbeads were rinsed three times in 25 µl

of buffer 4xSSC, 0.5% Tween 20 using the magnetic particle concentrator (MPC). Microbeads were re-suspended in 10 μ l of buffer, and added to the hybridization solution for immobilization under gentle continuous stirring for 30 min at room temperature. The beads were finally washed twice in 150 μ l of a 0.1xSSC, Tween 20 (0.5%) buffer using the MPC to remove the unbound material.

After resuspension in 60 μ l of 0.1xSSC, 0.5% Tween 20 buffer, microbeads were finally heated at 95°C for 20 min for denaturation of both the DNA hybridized triplex and the biotin-streptavidin bound. The microbeads were then immobilized by the MPC and the supernatant was collected for SERRS measurements.

- *SERRS measurements*

The silver colloid used for SERRS measurements was synthesized according to the Lee and Meisel protocol (39). 90 mg of silver nitrate AgNO_3 were dissolved in 500 ml of distilled water and heated under continuous stirring until boiling. After addition of 10 ml of sodium citrate solution (1%) the solution was maintained at boiling for 90 min. The silver colloid has been stored in the dark at room temperature. All silver colloid aliquots used in this study came from the same batch.

The eluted R6G probes contained in the supernatant after the assay were analyzed following Feuillie *et al.* 2011 (34). 20 μ l of the supernatant was mixed with 20 μ l of spermine (10^{-2} mol.l⁻¹) in a single-use PMMA spectroscopy cuvette. 500 μ l of silver colloid and 500 μ l of distilled water were added and the solution was homogenized prior to SERRS measurement.

Samples were analyzed with a visible Horiba Jobin Yvon® LabRam HR 800 Raman spectrometer, coupled to a Spectra Physics® 2018 Ar⁺/Kr⁺ 24 laser tuned at 514.5 nm (LGL, ENS de Lyon). The laser power on the sample was adjusted between 1.5 and 2 mW. The spectra were acquired with a spectrometer grating of 600 gr.mm⁻¹ centered at 1600 cm⁻¹. Spectra result from 1x30 s accumulations.

- *Quantification of the amount of DNA target*

SERRS spectra were processed with the Peakfit® software. R6G is easily identified thanks to a series of intense Raman peaks (34, 40, 41). The parameter chosen for quantification was the area of the most intense peak centered at 1650 cm^{-1} , noted A_{1650} (Figure 4). The peak areas allowed quantifying the amount of probe in the elution solution, as we previously showed (34). This parameter is positively correlated to the relative amount of DNA target in the initial solution.

Figure captions

Figure 1: Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from amplification of eleven double-stranded DNA molecules containing abasic sites using Rup_For_{5'} and Rup_Rev_{3'} primers (expected fragment size = 134 bp). PCR conditions are given in the “*Material and Methods: PCR conditions*” part. The size of some DNA markers in pb is indicated. All gels were revealed using the same transilluminator settings.

Figure 2 : Errors of amplification observed in the PCR products. Two types of errors were found : deletions and miscoding errors. The weighed average length of the PCR products is represented in red diamonds. The dotted bar represent the dispersion of obtained length. Primer sequences have been deleted from the analysis. Therefore, the full length expected sequence is here 95 bp instead of 134 bp, and is figured by a red dashed line. The blue histogram represents the percentage of miscoding errors retrieved in PCR products.

Figure 3 : SERRS-hybridization assay principle of double-stranded DNA detection. One strand is hybridized to 2 probes, a biotin-labeled capture probe and a R6G-labeled detection probe. The second strand is hybridized to three oligonucleotides which block the rehybridization to its complementary strand.

Figure 4 : SERRS-hybridization assay detection results. In grey is the SERRS signal obtained for the single-stranded non-degraded DNA sequence N_{5'}. In red is the SERRS signal obtained for the detection of the non-degraded N/N molecule. Degraded molecules appear in orange, except for molecules containing a strand with 5 abasic sites that appear in blue. All degraded molecules are detected with signals comparable to those of non-degraded molecules.

Concentrations used in this study: - Target: $5 \times 10^{-8} \text{M}$; - Blockers: $5 \times 10^{-5} \text{M}$; - Capture and detection probe: 10 mM.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Paleogenomics and Molecular Evolution team at IGFL for technical support and helpful comments. We warmly thank D. Sverjensky and J. Burden for improving the manuscript. The project was supported by the Interdisciplinary Program of CNRS "Interface physique, biologie et chimie: soutien à la prise de risque", the Interdisciplinary program of Ecole Normale Supérieure de Lyon and by the Région Rhone-Alpes CIBLE 2011.

References

1. Paabo S, Higuchi RG, & Wilson AC (1989) Ancient DNA and the Polymerase Chain-Reaction - the Emerging Field of Molecular Archaeology. *J Biol Chem* 264(17):9709-9712.
2. Hanni C, Brousseau T, Laudet V, & Stehelin D (1995) Isopropanol Precipitation Removes Pcr Inhibitors from Ancient Bone Extracts. *Nucleic Acids Research* 23(5):881-882.
3. Rohland N & Hofreiter M (2007) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* 2(7):1756-1762.
4. Slade I, *et al.* (2010) Constitutional translocation breakpoint mapping by genome-wide paired-end sequencing identifies HACE1 as a putative Wilms tumour susceptibility gene. *J Med Genet* 47(5):342-347.
5. Briggs AW, *et al.* (2009) Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes. *Science* 325(5938):318-321.
6. Stiller M, Knapp M, Stenzel U, Hofreiter M, & Meyer M (2009) Direct multiplex sequencing (DMPS)--a novel method for targeted high-throughput sequencing of ancient and highly degraded DNA. *Genome Res* 19(10):1843-1848.
7. Burbano HA, *et al.* (2010) Targeted Investigation of the Neandertal Genome by Array-Based Sequence Capture. *Science* 328(5979):723-725.
8. Rasmussen M, *et al.* (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463(7282):757-762.
9. Green RE, *et al.* (2010) A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 328(5979):710-722.
10. Miller W, *et al.* (2008) Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 456(7220):387-U351.
11. Heyn P, *et al.* (2010) Road blocks on paleogenomes-polymerase extension profiling reveals the frequency of blocking lesions in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* 38(16).
12. Paabo S (1989) Ancient DNA - Extraction, Characterization, Molecular-Cloning, and Enzymatic Amplification. *P Natl Acad Sci USA* 86(6):1939-1943.
13. Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, & Paabo S (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 24(7):1304-1307.
14. Willerslev E & Cooper A (2005) Ancient DNA. *P Roy Soc B-Biol Sci* 272(1558):3-16.
15. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, & Denvir J (2004) Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method. *Biochem Bioph Res Co* 323(3):823-830.
16. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, & Denvir J (2007) DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem Bioph Res Co* 355(2):431-437.

17. Haracska L, Washington MT, Prakash S, & Prakash L (2001) Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase ϵ . *J Biol Chem* 276(9):6861-6866.
18. Fromenty B, Demeilliers C, Mansouri A, & Pessayre D (2000) Escherichia coli exonuclease III enhances long PCR amplification of damaged DNA templates. *Nucleic Acids Res* 28(11):E50.
19. Briggs AW, *et al.* (2010) Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* 38(6).
20. Chakravarti D, *et al.* (2008) The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat Res-Gen Tox En* 649(1-2):161-178.
21. McDonald JP, *et al.* (2006) Novel thermostable Y-family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs. *Nucleic acids research* 34(4):1102-1111.
22. d'Abbadie M, *et al.* (2007) Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA. *Nat Biotechnol* 25(8):939-943.
23. Gloeckner C, Sauter KBM, & Marx A (2007) Evolving a thermostable DNA polymerase that amplifies from highly damaged templates. *Angew Chem Int Edit* 46(17):3115-3117.
24. Zhao XJ, Tapecc-Dytioco R, & Tan WH (2003) Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles. *J Am Chem Soc* 125(38):11474-11475.
25. Taton TA, Mirkin CA, & Letsinger RL (2000) Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 289(5485):1757-1760.
26. Storhoff JJ, *et al.* (2004) Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosens Bioelectron* 19(8):875-883.
27. Docherty FT, *et al.* (2004) The first SERRS multiplexing from labelled oligonucleotides in a microfluidics lab-on-a-chip. *Chem Commun* (1):118-119.
28. Faulds K, Jarvis R, Smith WE, Graham D, & Goodacre R (2008) Multiplexed detection of six labelled oligonucleotides using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS). *Analyst* 133(11):1505-1512.
29. Feuillie C, *et al.* (2012) Enzyme-free detection and quantification of double-stranded nucleic acids. *Anal Bioanal Chem*.
30. Graham D & Faulds K (2008) Quantitative SERRS for DNA sequence analysis. *Chem Soc Rev* 37(5):1042-1051.
31. Graham D, *et al.* (1997) Selective detection of deoxyribonucleic acid at ultralow concentrations by SERRS. *Anal Chem* 69(22):4703-4707.
32. Faulds K, McKenzie F, Smith WE, & Graham D (2007) Quantitative simultaneous multianalyte detection of DNA by dual-wavelength surface-enhanced resonance Raman scattering. *Angew Chem Int Edit* 46(11):1829-1831.
33. Monaghan PB, *et al.* (2007) Bead-based DNA diagnostic assay for chlamydia using nanoparticle-mediated surface-enhanced resonance Raman scattering detection within a lab-on-a-chip format. *Anal Chem* 79(7):2844-2849.
34. Feuillie C, *et al.* (2011) A novel SERRS sandwich-hybridization assay to detect specific DNA target. *Plos One* 6(5):e17847.
35. Zhou W & Doetsch PW (1993) Effects of Abasic Sites and DNA Single-Strand Breaks on Prokaryotic Rna-Polymerases. *P Natl Acad Sci USA* 90(14):6601-6605.
36. Shibutani S, Takeshita M, & Grollman AP (1997) Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site - A mechanistic study of the "A rule". *J Biol Chem* 272(21):13916-13922.

-
37. Beaulieu M, Larson GP, Geller L, Flanagan SD, & Krontiris TG (2001) PCR candidate region mismatch scanning: adaptation to quantitative, high-throughput genotyping. *Nucleic Acids Research* 29(5):1114-1124.
 38. Gouy M, Guindon S, & Gascuel O (2010) SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol Biol Evol* 27(2):221-224.
 39. Lee PC & Meisel D (1982) Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J Phys Chem-Us* 86(17):3391-3395.
 40. Faulds K, Graham D, & Smith WE (2004) Evaluation of surface-enhanced resonance Raman scattering for quantitative DNA analysis. *Anal Chem* 76(2):412-417.
 41. Jensen L & Schatz GC (2006) Resonance Raman scattering of rhodamine 6G as calculated using time-dependent density functional theory. *J Phys Chem A* 110(18):5973-

Table 1: Nucleic sequences used in this study. A 5' index indicates the sequence is in the 5'-3' orientation. A 3' index indicates the sequence is in the 3'-5' orientation. Sequences are aligned, and abasic sites are indicated in red with their positions. PCR primers Rup_For_{5'} and Rup_Rev_{3'} and their alignment to target sequences are also represented. SERRS capture probe, detection probe and 3 blockers are labeled Cap.pr._{3'}, Det.pr._{3'}, Block1_{5'}, Block2_{5'} and Block3_{5'}, respectively.

Name	Sequence	A.S.
N _{5'}	GCCATGAAGCACGCACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACAAAC <i>Bases ranging from 1 to 139</i>	0
I _{5'}*	1
II _{5'}*	2
V _{5'}*	5
Cap.pr. _{3'}	-----GGAGTTCACCTTATGTCTGTG-----	-
Det.pr. _{3'}	-----GTTCTCCTCTGTTTCAGCATTTG-----	-
Rup_Rev _{3'}	-----CCTTTCACACGAACCTGT-----	-
N _{3'}	CGGTACTTCGTGCGTGTGTGGCGGGCAGTGGGAGGAGTTCACCTTATGTCCTGTGAGTTTGGATAAAATTGTGTGGTTAGTGTGTTCTCCTCTGTTTCAGCATTTGTTCCATTTCGTATGACCTTTCACACGAACCTGTTTG	0
I _{3'}*	1
IV _{3'}*	4
Block1 _{5'}	--CATGAAGCACGCACACCGCCCGTCACCCCT-----	-
Block2 _{5'}	-----TCAAACCTATTTAAACACACCAATCACA-----	-
Block3 _{5'}	-----AGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA-----	-
Rup_For _{5'}	--CATGAAGCACGCACACCGC-----	-

Table 2: Combination of double-stranded molecules investigated in this study. $N_{5'}/N_{3'}$ is the original non-degraded molecule.

Name	Abasic sites on $R_{5'}$	Abasic sites on $R_{3'}$
$N_{5'}/N_{3'}$	0	0
$N_{5'}/I_{3'}$	0	1
$\Pi_{5'}/N_{3'}$	2	0
$N_{5'}/IV_{3'}$	0	4
$V_{5'}/N_{3'}$	5	0
$I_{5'}/I_{3'}$	1	1
$\Pi_{5'}/I_{3'}$	2	1
$I_{5'}/IV_{3'}$	1	4
$V_{5'}/I_{3'}$	5	1
$\Pi_{5'}/IV_{3'}$	2	4
$V_{5'}/IV_{3'}$	5	4

Table 3: Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the N₅/N₃ molecule. The N₅ and C_N₃ molecules, with no abasic site, are taken as a reference. The C_N₃ corresponds to N₃ strand in the reverse complementary orientation. PCR amplification primers are removed from the analysis. Differences from the N molecule are represented in red. For each haplotype sequence, the observed frequency and percentage are given.

	5'3' Sequence	Freq.	%
N ₅ and C_N ₃	(Primer) CCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACT (Primer)		
1	10	53%
2 -	4	21%
3 -	1	5%
4 - - - - -	1	5%
5 -	1	5%
6 W -	1	5%
7 -	1	5%

Table 4: Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the I₅/I₃ molecule. The I₅ and I₃ molecules are taken as a reference. The C_I₃ corresponds to I₃ strand in the reverse complementary orientation. Abasic sites are represented as red stars *. PCR amplification primers are removed from the analysis. Differences from the initial molecule are represented in red. For each haplotype sequence, the observed frequency and percentage are given.

	5'3' Sequence	Freq.	%
I ₅	(Primer) CCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCTATTTAAACAC*CCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACT (Primer)		
C_I ₃	(Primer) CCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATAC*GGACACTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACT (Primer)		
1-.....-.....	1	4%
2-.....-.....	1	4%
3-.....-.....	1	4%
4-.....-TC.....	1	4%
5C.....-.....	1	4%
6C.....-.....	1	4%
7-.....G.....	1	4%
8-.....-.....	1	4%
9-.....-.....	1	4%
10-.....-.....	2	8%
11-.....-.....	1	4%
12-.....-.....	1	4%
13-.....-.....	1	4%
14-.....-.....	1	4%
15-.....-.....	1	4%
16-.....-.....	1	4%
17-.....C.....	1	4%
18-.....-.....	1	4%
19-.....-.....	1	4%
20-.....-.....	1	4%
21-.....-.....	1	4%
22-.....-TC.....	1	4%
23-.....-.....	1	4%
24-.....-.....	1	4%

Table 5: Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the V₅/IV₃ molecule. The V₅ and C_IV₃ molecules are taken as a reference. The C_IV₃ corresponds to IV₃ strand in the reverse complementary orientation. Abasic sites are represented as red stars *. PCR amplification primers are removed from the analysis. Differences from the initial molecule are represented in red. For each haplotype sequence, the observed frequency and percentage are given.

	5'3' Sequence	Freq.	%
V ₅	(Primer)CCGTCACCCCTCCTCAAGTGAA*ACAGGACA*TCAAAACC*ATTTAAAC*CACCAATC*CACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACT(Primer)		
C_IV ₃	(Primer)CCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACA*GACACTCA*AACCTATT*AAACACAC*AATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACT(Primer)		
1-.....	3	13%
2GT.....	1	4%
3	1	4%
4	1	4%
5	T.....	1	4%
6	1	4%
7	1	4%
8	2	9%
9	1	4%
10	1	4%
11	1	4%
12	1	4%
13	1	4%
14	1	4%
15	1	4%
16T.	1	4%
17T.....	1	4%
18	1	4%
19	1	4%
20TA.....	1	4%

Figure 1

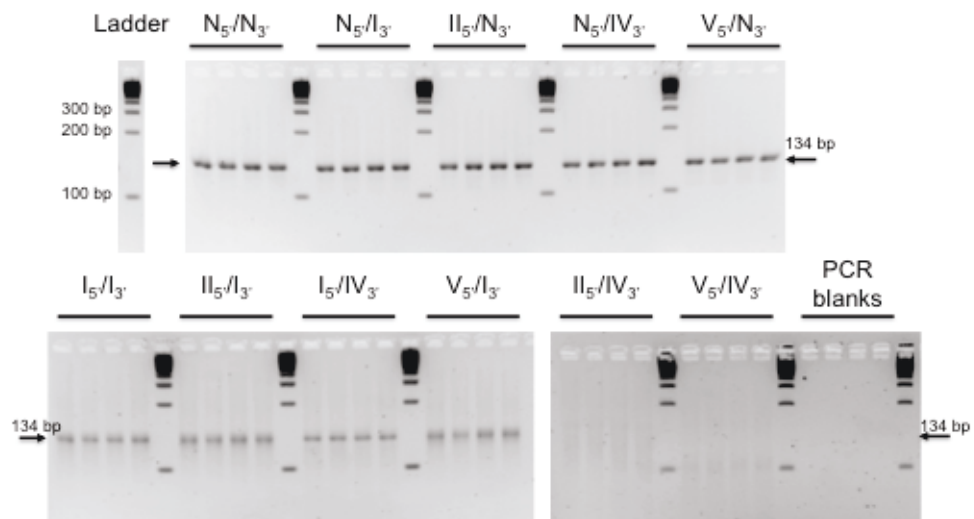


Figure 2

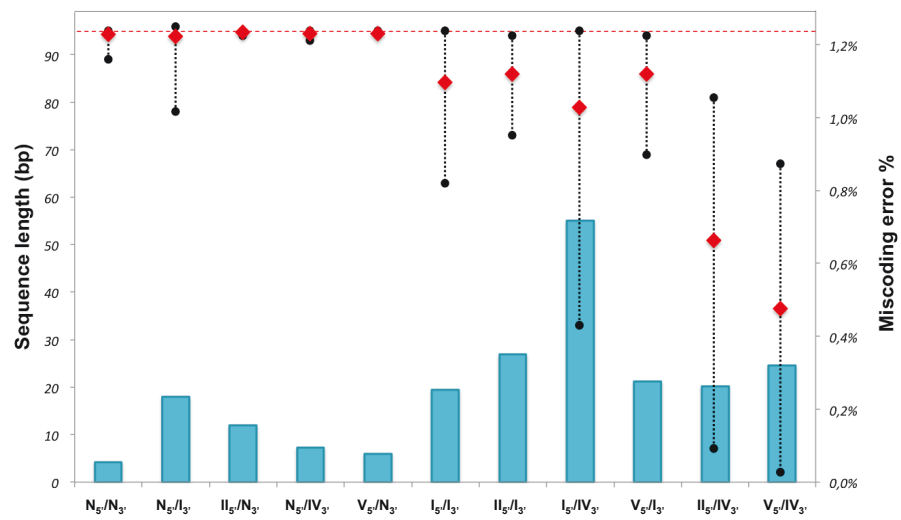


Figure 3

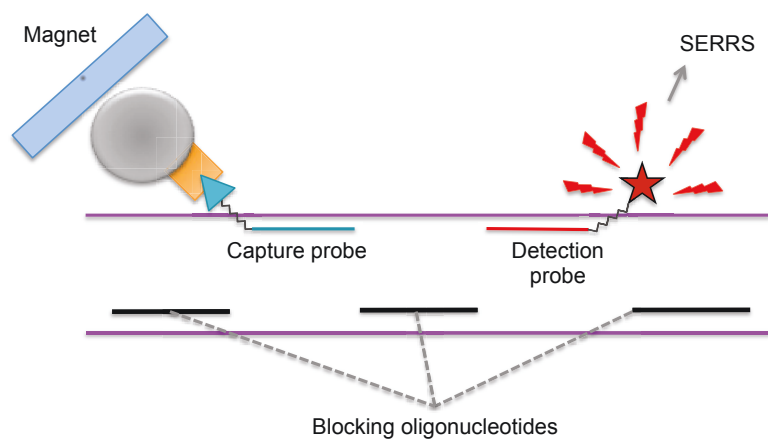
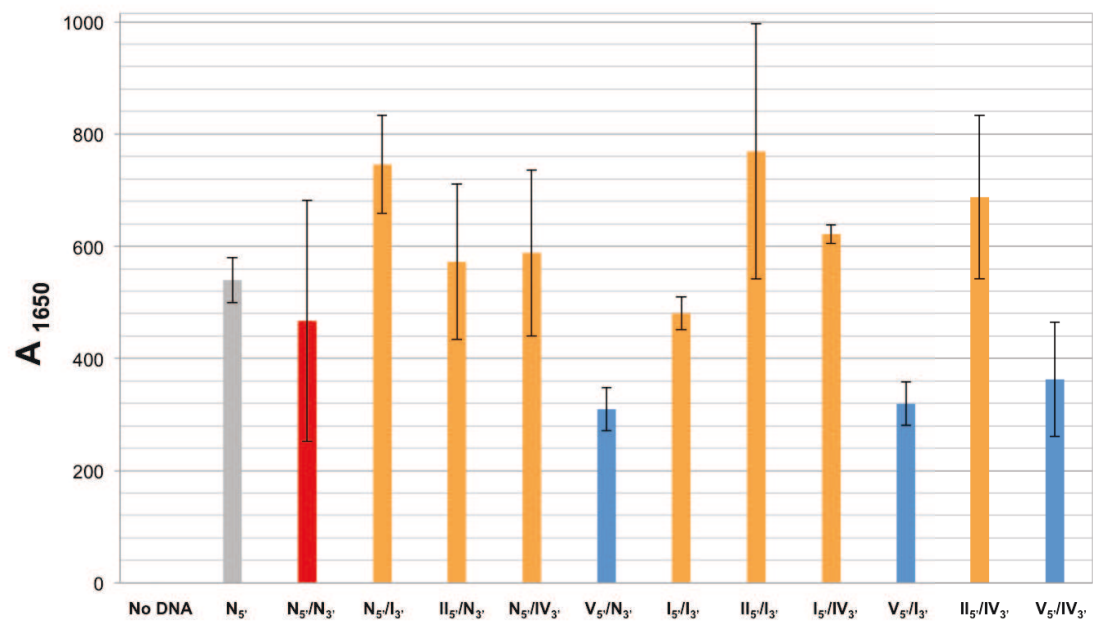


Figure 4



III. Compléments expérimentaux : la réaction de PCR

La réaction de PCR utilisée ici est tout à fait classique, et je n'en parlerai donc que brièvement.

La réaction de PCR se fait dans un volume de 25 µl. On mélange :

- 0.5 µl d'enzyme Taq Gold polymerase (5U/µl, Applied-Biosystems®)
- 2.5 µl de buffer 10X Gold (milieu de l'enzyme)
- 2.5 µl de MgCl₂ (25 mM)
- 0.5 µl de chaque amorce (25 µM)
- 0.25 µl de nucléotides tri-phosphatés dNTP (100 µM)
- 1.5 µl d'ADN cible (5×10^{-8} M).

Les amorces de 21 et 18 bases, respectivement, sont spécifiques d'une séquence cible de 139 bases d'ADN mitochondrial (gène 12S ARNr) de *Rupicapra rupicapra* (Chamois).

On note que l'enzyme utilisée, la Taq Gold, a une meilleure efficacité que la Taq polymérase, et est donc beaucoup utilisée en paléogénétique.

L'amplification se fait en thermocycleur, selon le cycle thermique suivant [dénaturation à 95°C, 30 s. ; hybridation des amorces à 58°C, 30s. ; élongation à 72°C, 30s], répété 45 fois.

Une étape finale d'élongation de 7 min clôture le programme.

Les produits de PCR sont visualisés sur gel d'électrophorèse par révélation au bromure d'éthidium (BET) sous illumination UV.

IV. Conclusion

La méthode de détection d'ADN double-brin développée au cours de cette thèse a permis de détecter une gamme de molécules altérées contenant des sites abasiques en nombres variés.

Les résultats d'amplification par PCR de ces mêmes molécules ont démontré une baisse de fidélité de la réaction enzymatique quand le degré d'altération augmente. Plus il y a de sites abasiques sur les 2 brins de la molécule, plus il y a d'erreurs d'incorporation et de

suppressions de bases. Les molécules les plus dégradées, portant 6 et 9 sites abasiques en tout répartis sur les 2 brins, n'ont pas pu être détectées par PCR à cause de trop larges délétions. La méthode Hybridation-SERRS détecte toute les molécules, même les plus dégradées avec des intensités de signal similaires.

La méthode SERRS-hybridation permet donc de détecter de l'ADN double-brin réfractaire à la PCR, et pourrait s'imposer comme une alternative forte aux méthodes enzymatiques, en particulier pour l'analyse d'ADN dégradé. De nombreux échantillons qui jusqu'alors ne donnaient aucun résultats en PCR pourraient ainsi être analysés ; des opportunités nouvelles pourraient alors s'ouvrir à la recherche en ADN ancien, allant peut-être jusqu'à repousser la limite d'âge des séquences retrouvées.

Références bibliographiques

- Briggs, A. W., J. M. Good, et al. (2009). "Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes." Science **325**(5938): 318-321.
- Briggs, A. W., U. Stenzel, et al. (2010). "Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA." Nucleic Acids Research **38**(6).
- Burbano, H. A., E. Hodges, et al. (2010). "Targeted Investigation of the Neandertal Genome by Array-Based Sequence Capture." Science **328**(5979): 723-725.
- Green, R. E., J. Krause, et al. (2010). "A Draft Sequence of the Neandertal Genome." Science **328**(5979): 710-722.
- Miller, W., D. I. Drautz, et al. (2008). "Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth." Nature **456**(7220): 387-U351.
- Rasmussen, M., Y. R. Li, et al. (2010). "Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo." Nature **463**(7282): 757-762.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1997). "Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site - A mechanistic study of the "A rule"." Journal of Biological Chemistry **272**(21): 13916-13922.
- Sikorsky, J. A., D. A. Primerano, et al. (2007). "DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency." Biochemical and Biophysical Research Communications **355**(2): 431-437.
- Stiller, M., M. Knapp, et al. (2009). "Direct multiplex sequencing (DMPS)--a novel method for targeted high-throughput sequencing of ancient and highly degraded DNA." Genome Res **19**(10): 1843-1848.
- Takeshita, M., C. N. Chang, et al. (1987). "Oligodeoxynucleotides Containing Synthetic Abasic Sites - Model Substrates for DNA-Polymerases and Apurinic Apyrimidinic Endonucleases." Journal of Biological Chemistry **262**(21): 10171-10179.
- Zhou, W. and P. W. Doetsch (1993). "Effects of Abasic Sites and DNA Single-Strand Breaks on Prokaryotic Rna-Polymerases." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(14): 6601-6605.

Conclusions et perspectives

I. Conclusions

Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis le développement d'une méthode totalement non-enzymatique de détection d'ADN simple et double-brin.

Cette méthode, appelée Hybridation-SERRS, est spécifique et quantitative, rapide (2 heures en tout pour l'analyse d'un échantillon) et peu onéreuse. Elle permet de plus la détection simultanée de plusieurs séquences, et donc potentiellement de plusieurs espèces à la fois. Par ailleurs, nous avons démontré sa capacité à détecter des séquences d'ADN double-brin dégradées, même les plus dégradées que la PCR ne détecte pas. La méthode Hybridation-SERRS est donc indépendante des contraintes enzymatiques, ce qui en fait une alternative très prometteuse à l'amplification par PCR pour la détection d'ADN altéré. Les domaines de la paléogénétique, de la médecine, ainsi que l'agroalimentaire et tous les domaines où l'ADN est altéré et/ou coextrait avec des inhibiteurs de la réaction de PCR, bénéficieront directement de cette avancée.

Un verrou reste encore à lever afin d'analyser de l'ADN naturel. Pour le moment, nous atteignons une limite de détection de 5×10^{-9} M. Cette concentration, bien que relativement faible, représente encore un grand nombre de molécules, *e.g.* 6×10^{10} copies dans les 20 μ l analysés en routine, qu'il est quasiment impossible d'extraire un échantillon moderne ou ancien. En effet, une extraction d'ADN provenant d'un échantillon ancien donnera plutôt lieu à concentrations plus faibles entre 10^{-13} M et 10^{-15} M. Afin de pouvoir analyser des échantillons naturels, modernes et anciens, nous devons réussir à détecter de l'ADN à des concentrations de l'ordre de 10^{-14} M environ. Aussi, il serait bénéfique d'améliorer la spécificité de la détection, afin de pouvoir discriminer des séquences d'ADN ne différant que d'une base.

Je souhaite d'ores et déjà proposer deux améliorations notables à la méthode hybridation – SERRS dans ce chapitre.

II. Perspectives

II.1. Amélioration de la limite de détection

On distinguera donc l'augmentation de l'**efficacité** de la méthode, qui correspondra à une amplification du signal SERRS, de sa **sensibilité**, qui permettra d'abaisser la limite de détection et de travailler sur des échantillons d'ADN à très faibles concentrations, notamment en limitant les pertes de matériel.

II.1.1. Augmentation de l'efficacité de la méthode

Notre méthode de détection repose sur l'hybridation d'une sonde marquée sur une séquence cible. Ainsi si le signal obtenu est positivement corrélé au nombre de molécules d'ADN cible au départ dans l'échantillon, il ne peut au mieux qu'être égal à la limite de détection de la sonde marquée, soit de l'ordre de 10^{-12} M (Chapitre 2). L'utilisation de sondes de détections portant de multiples molécules de marqueurs SERRS permettrait d'amplifier artificiellement le signal.

Des nanobilles d'or peuvent être fonctionnalisées par 100-200 oligonucléotides thiolés à 1 extrémité (Nam, Stoeva et al. 2004; Thaxton, Hill et al. 2005; Hill, Mirkin et al. 2007). Cette propriété est utilisée dans la méthode du code-barre biologique (Nam, Stoeva et al. 2004; Thaxton, Hill et al. 2005; Hill and Mirkin 2006). Pour une molécule cible, ce n'est pas un oligonucléotide « code barre » qui est fixé, mais une particule d'or recouverte de codes barres, ce qui constitue une amplification artificielle et non-enzymatique de la quantité d'ADN cible présente. Je propose donc de fonctionnaliser des particules d'or non pas avec des oligonucléotides simples comme dans la méthode de code-barre biologique, mais avec des oligonucléotides portant un marqueur SERRS résonant. Les billes d'or ainsi fonctionnalisées seraient des « multi-sondes » utilisables dans la méthode Hybridation – SERRS. Des tests

préliminaires ont été réalisés et sont présentés en **Annexe 1**. Le procédé est prometteur et a permis d'obtenir un signal SERRS amplifié d'un facteur 15. Toutefois, l'utilisation de ces billes d'or fonctionnalisées n'améliore pas la sensibilité.

Les billes d'or fonctionnalisées pourraient également être utilisées dans une réaction d'hybridation cyclique impliquant des particules d'or portant des oligonucléotides « doubles » composées de 2 courtes séquences. Nous illustrerons cette méthode par un cas à 4 niveaux de nanoparticules d'or (**Figure VI – 1**).

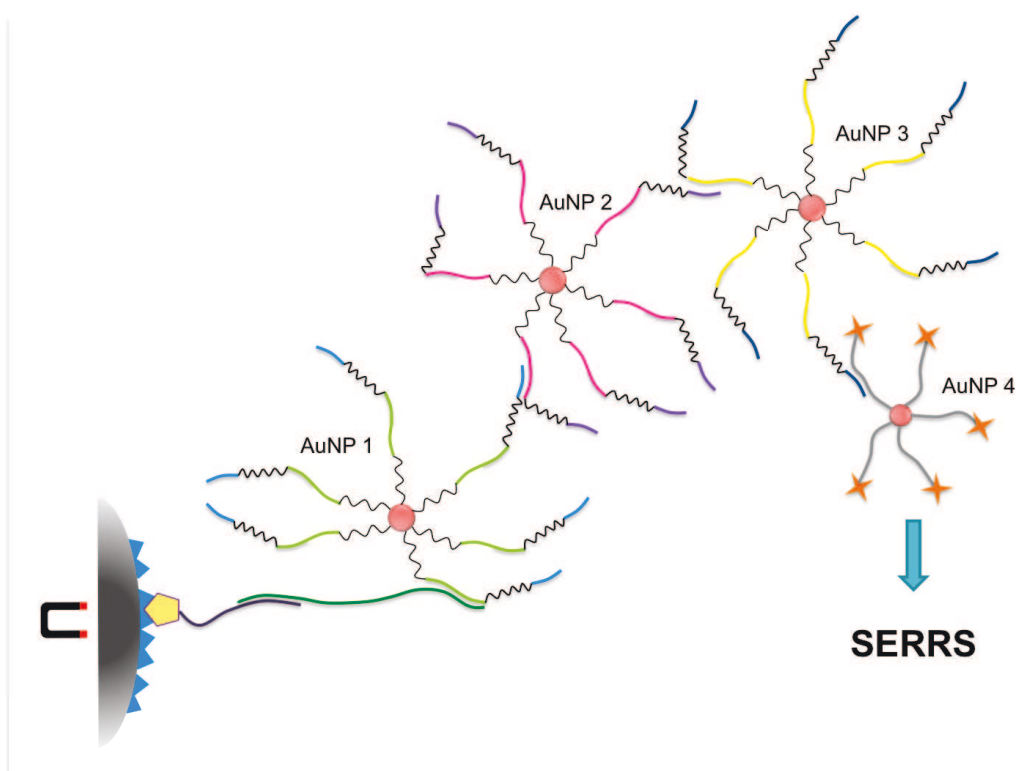


Figure VI-1 : Principe d'amplification cyclique appliqué à la méthode Hybridation-SERRS.

La première particule AuNP1 porte 2 séquences : la première est spécifique de la séquence cible, et la seconde s'hybride spécifiquement à une des séquences présentes sur la particule d'or AuNP2. Cette particule AuNP2 présente 2 séquences aléatoires non spécifiques de la cible. De la même façon, une 3^e particule d'or AuNP3 est fonctionnalisée avec des doubles-sondes à séquences spécifiques aléatoires, s'hybridant à 1 des séquences de la particule AuNP2. Enfin, des particules d'or AuNP4, fonctionnalisées avec des sondes de détection

SERRS, s'hybrident aux particules AuNP3. Si on considère que la fixation des sondes a été maximale, alors pour 1 molécule cible le nombre de particules d'or AuNP détectables en SERRS sera de 8×10^6 . En théorie, on pourra ainsi amplifier le signal final d'un facteur 10^6 .

II.1.2. Augmentation de la sensibilité de la méthode

Bien que l'on augmente l'efficacité de la méthode en utilisant des nanoparticules d'or greffées, sa sensibilité n'est toutefois pas augmentée et la limite de détection n'est pas abaissée.

Comme nous l'avons fait pour améliorer la spécificité de la méthode présentée dans le chapitre 3, nous pouvons jouer sur les conditions d'hybridation des sondes, autrement dit la stringence de la solution. À fortes températures et faible salinité, la stringence est forte et maintenir une hybridation requiert une grande complémentarité des séquences. À faible température, forte salinité, la stringence est faible et les hybridations non-spécifiques sont favorisées. On envisage donc d'examiner des gammes plus vastes de salinités de lavages, ainsi que de température d'hybridation et de lavage.

On pourra également modifier les sondes de détection, en jouant par exemple sur la position des mismatches. Une mismatch au centre d'une sonde facilitera les hybridations spécifiques. On peut également envisager d'utiliser des sondes de détection et de capture en ARN, car les duplex ARN/ADN sont plus stables que les duplexes ADN/ADN (V. Laudet, communication personnelle).

Enfin, afin de minimiser les pertes de matériel une liaison covalente serait appréciable au niveau de la sonde de capture, par liaison thiol comme le font par exemple Hill et al. (2007). Des billes magnétiques sont commercialisées avec un cœur magnétique et 1 couche externe variable ; avec une couche externe composée d'or, nous pourrions fixer en surface des billes magnétiques des oligonucléotides à fonction thiol (Jaffrezic-Renault, Martelet et al. 2007). Cependant, notre méthode serait alors un peu moins flexible et versatile.

II.2. Application au domaine biomédical

La méthode de détection SERRS-hybridation pourra être appliquée au domaine du diagnostique biomédical, en particulier en cancérologie. En effet, les cellules tumorales expriment certains gènes en plus grandes quantités comparées aux cellules saines. Hessels et al. (2003), ont ainsi détecté 66 fois plus d'ARN messenger du gène DD3^{PCA3}, dans les tissus cancéreux que dans les tissus prostatiques bénins. On peut donc mesurer le taux d'expression de ce gène afin de réaliser le diagnostique du cancer de la prostate. Cela peut également être effectué en ciblant l'ARN messenger correspondant à la protéine PSA (Antigène Spécifique de Prostate) (de la Taille 1997). D'autres types de cancers, comme le cancer du sein (Bertucci, Houlgatte et al. 2001) ont une expression génique bien étudiée et identifiée, et peuvent bénéficier du ce type de diagnostique.

En moyenne, on détecte 160×10^5 copies de la molécule d'ARNm par μg de tissus cancéreux, contre seulement 2×10^5 copies/ μg de tissus sain. Cela correspond à 2×10^{-17} mol/ μg de tissus cancéreux. Une tumeur de 100 g produira donc 2×10^{-9} moles d'ARNm. Si on considère qu'un homme possède 5 litres de sang, les ARNm sont donc présents dans le sang en concentration $0,4 \times 10^{-9}$ M.

Une amélioration de la sensibilité de notre méthode d'un ordre de grandeur permettra de détecter les ARNm spécifiques de certains cancers lors d'une prise de sang. Une amélioration de plusieurs ordres de grandeurs permettrait de détecter la présence de tumeurs dès leur apparition. Par exemple, avec une limite de détection de l'ordre de 10^{-12} M, nous pourrions détecter dans le sang la présence d'ARNm exprimés par une tumeur d'1 gramme.

La méthode Hybridation – SERRS a permis de détecter spécifiquement des séquences très proches (Feuillie, Merheb et al. 2011; Feuillie, Merheb et al. 2012), différant de 7 ou 8 bases dans les zones d'hybridation des sondes de capture et de détection. Notre méthode a le potentiel requis pour des études diagnostiques : elle est rapide, versatile, et permet de trancher

facilement quant à la présence de l'ADN cible. Il serait très intéressant d'augmenter la spécificité de la méthode Hybridation-SERRS afin de pouvoir discriminer des séquences qui diffèrent entre elles d'une seule paire de bases (Kim and Misra 2007; Bichenkova, Lang et al. 2011), élargissant ainsi la gamme de diagnostics possibles. Des différences d'une seule base, appelées SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont par exemple impliqués dans le développement de maladies sévères telles que le diabète de type 2, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ou certains cancers (Kim and Misra 2007; Bichenkova, Lang et al. 2011).

Des tests préliminaires effectués dans l'optique d'accentuer la spécificité de la méthode sont présentés en **Annexe 2**. En optimisant la stringence du milieu de lavage (salinité, température) ainsi que le nombre de lavages, nous sommes capables de discriminer 2 séquences présentant une mismatch par sonde nucléique de capture et de détection, mais pas encore des séquences ne différant que d'1 seule mismatch.

La méthode apparaît prometteuse, et une très large gamme de diagnostics pourront être envisagés.

Références bibliographiques

- Bertucci, F., R. Houlgatte, et al. (2001). "Molecular typing of breast cancer: transcriptomics and DNA microarrays." *Bulletin Du Cancer* **88**(3): 277-286.
- Bichenkova, E. V., Z. L. Lang, et al. (2011). "DNA-mounted self-assembly: New approaches for genomic analysis and SNP detection." *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **1809**(1): 1-23.
- de la Taille, A., Colombel, M., Amsellem, S., Muscatelli, B., Radvanyi, F., Mazeman, E., Abbou, C.C., Chopin, D. (1997). "Le gène du PSA : intérêt pour la détection des cellules circulantes dans le cancer de la prostate." *Progrès en urologie* **7**: 930-936.
- Feuillie, C., M. M. Merheb, et al. (2011). "A novel SERRS sandwich-hybridization assay to detect specific DNA target." *Plos One* **6**(5): e17847.
- Feuillie, C., M. M. Merheb, et al. (2012). "Enzyme-free detection and quantification of double-stranded nucleic acids." *Anal Bioanal Chem*.
- Hessels, D., J. M. T. K. Gunnewiek, et al. (2003). "DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer." *European Urology* **44**(1): 8-15.
- Hill, H. D. and C. A. Mirkin (2006). "The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange." *Nature Protocols* **1**(1): 324-336.
- Hill, H. D., C. A. Mirkin, et al. (2007). "Nonenzymatic detection of bacterial genomic DNA using the bio bar code assay." *Analytical Chemistry* **79**(23): 9218-9223.
- Jaffrezic-Renault, N., C. Martelet, et al. (2007). "Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads." *Sensors* **7**(4): 589-614.
- Kim, S. and A. Misra (2007). "SNP genotyping: Technologies and biomedical applications." *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**: 289-320.
- Nam, J. M., S. I. Stoeva, et al. (2004). "Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity." *Journal of the American Chemical Society* **126**(19): 5932-5933.
- Thaxton, C. S., H. D. Hill, et al. (2005). "A bio-bar-code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release." *Analytical Chemistry* **77**(24): 8174-8178.

Annexes

ANNEXE 1

Nous proposons d'utiliser des particules d'or fonctionnalisées par des sondes de détection SERRS, afin d'amplifier le signal SERRS obtenu par la méthode Hybridation – SERRS.

I. Matériel

I.1. Oligonucléotides utilisés

Nous avons fixé sur des particules d'or des oligonucléotides à fonction thiol marqués par une molécule de R6G, et les avons utilisés dans le protocole hybridation-SERRS. Les séquences utilisées pour ces tests sont présentées dans le **Tableau A1 - 1**.

Tableau A1 – 1 : Séquences utilisées lors des tests d'amplification du signal

Nom	Séquence 5'-3'	Modifications
Cible	GCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGT GAATACAGGACACTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCA CACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGA AAGTGTGCTTGGACAAAC	-
R6G-thiol	TGTTACGACTTGTCTCCTCTTG	5'-R6G 3'-Thiol-C6
Biotine	GTGTCCTGTATTCACTTGAGG	3'-Biotin-TEG

I.2. Synthèse du colloïde d'or et fonctionnalisation des particules

Le colloïde d'or est synthétisé par réduction d'une solution d'hydrochlorate d'or par une solution de citrate de sodium en modifiant le protocole de Lee et Meisel (Lee and Meisel 1982). 24 mg de HAuCl_4 sont dissout dans 50 ml d'eau distillée portés à ébullition. Après ajout de 6 ml d'une solution de citrate de sodium à 1%, la solution est maintenue à ébullition pendant 15 minutes. Le liquide obtenu est refroidi à température ambiante, puis placé à l'abri de la lumière. Les propriétés optiques du colloïde d'or obtenu ont été mesurées et comparées à celles du colloïde d'argent utilisé pour les mesures SERRS (**Figure A1 - 1**). Le colloïde d'or présente une longueur d'onde d'absorption maximale aux alentours de 520 nm.

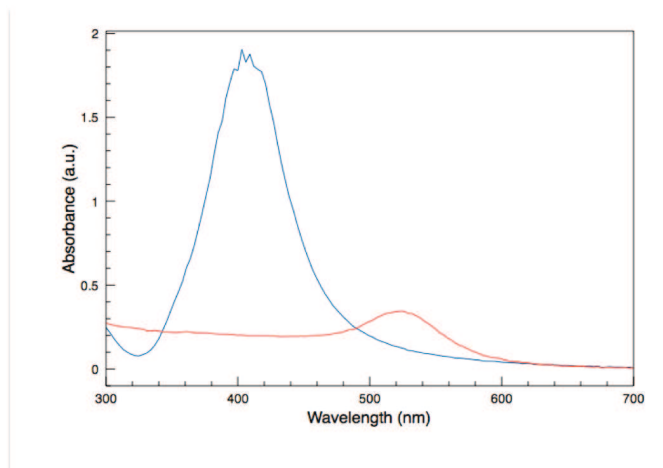


Figure A1 – 1 : Absorbance des colloïdes d’or et d’argent utilisés lors de notre étude.

Le colloïde synthétisé est séparé en 2 aliquots, afin de tester 2 protocoles de fonctionnalisation (**Figure A1 – 2**).

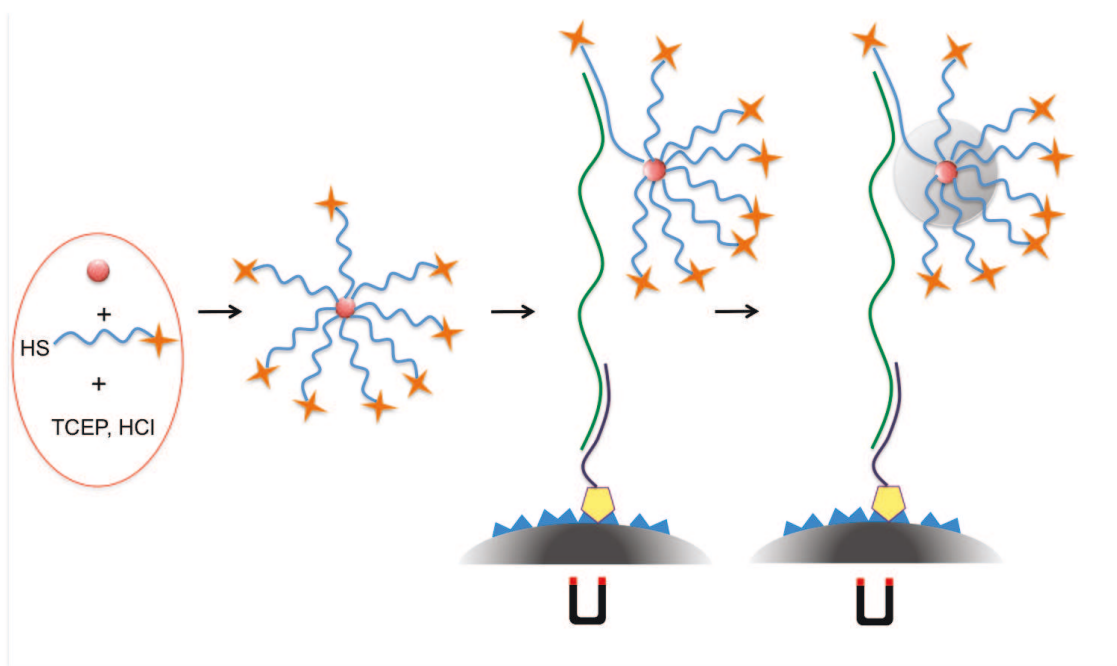


Figure A1 – 2 : Utilisation de billes d’or fonctionnalisées en tant que sonde de détection dans la méthode Hybridation-SERRS.

Le protocole 1 implique une concentration x4 des particules d’or par centrifugation. Les nanobilles sont ensuite fonctionnalisées avec un oligonucléotide marqué d’après le protocole de Storhoff et al. (1998). Pour cela, 1 ml de colloïde d’or concentré est mélangé à

37 μl d'une solution d'oligonucléotide thiol marqué par une molécule de R6G en concentration 100 μM . Après environ 16h à température ambiante, cette solution est portée à une concentration de 0.1 M en NaCl dans un milieu tampon phosphaté composé de Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 (10 mM). On ajoute donc à la solution 115 μl de phosphate buffer (0.1 M), NaCl 1 M. Le mélange est maintenu au repos 48h, puis centrifugé 40 min à 13 200 rpm (16100 g). Le surnageant contenant les réactifs en excès est éliminé, et les particules d'or sont remises en suspension dans 50 μl de phosphate buffer 10 mM, NaCl 0.1 M. Durant cette étape, on peut perdre jusqu'à 30% des particules d'or (Storhoff, Elghanian et al. 1998).

La seconde partie du colloïde d'or est fonctionnalisée avec des sondes R6G-thiol préalablement traitées par une solution de tris-(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP). En effet, le TCEP active les oligonucléotides à fonction thiol (Ding, Zhang et al. 2009), ce qui optimise la fixation des sondes par liaisons disulfide. Des sondes R6G-thiol (35 μl ; 100 μM) sont incubés pendant 10-15 min avec 9 μl de TCEP, HCl, 0.5M. Un ml de colloïde d'or y est par la suite ajouté, puis la suite du protocole de Storhoff (1998) est reproduit à l'identique.

La concentration approximative en billes, et donc en oligonucléotides, dans notre solution finale de particules fonctionnalisées peut être calculée. D'après Storhoff (1998), un colloïde synthétisé comme le notre présente une concentration en nanoparticules d'or de 17 nM environ, ce qui correspond à 10^{13} particules par ml. Nous avons introduit dans le milieu 37 μl d'une solution d'oligonucléotides marqués en concentration 100 μM , ce qui correspond à $2,17 \times 10^{15}$ molécules. On considère qu'il est possible de fixer au maximum 200 molécules par particule d'or (Nam, Stoeva et al. 2004; Thaxton, Hill et al. 2005; Hill, Mirkin et al. 2007). Si on considère que les 10^{13} particules d'or présentes dans la solution sont saturées à la fin de ce protocole, alors (200×10^{13}) molécules ont été utilisées, donc 2×10^{15} molécules. Si nous perdons 30% des particules lors de la centrifugation et élimination du surnageant, il reste

7×10^{12} particules, ce qui correspond à $1,16 \times 10^{-11}$ moles de particules. Nous avons donc repris ces particules greffées dans un faible volume, 50 ml, permettant d'obtenir une solution de sondes de détection améliorées en concentration 2.3×10^{-7} M. Nous pouvons donc travailler jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-7} M pour nos tests préliminaires.

II. Résultat préliminaire

Des échantillons d'ADN simple brin (*R.rup*, 139 bases) ont été analysés par la méthode Hybridation-SERRS mise au point dans le chapitre 2, en comparant une sonde de détection classique, *i.e.* un oligonucléotide marqué par une molécule de R6G, des nanoparticules d'or fonctionnalisées selon le protocole de Storhoff notées AuNP ainsi que des particules fonctionnalisées selon le protocole de Storhoff modifié notées AuNP-TCEP (**Figure A1–3 a**).

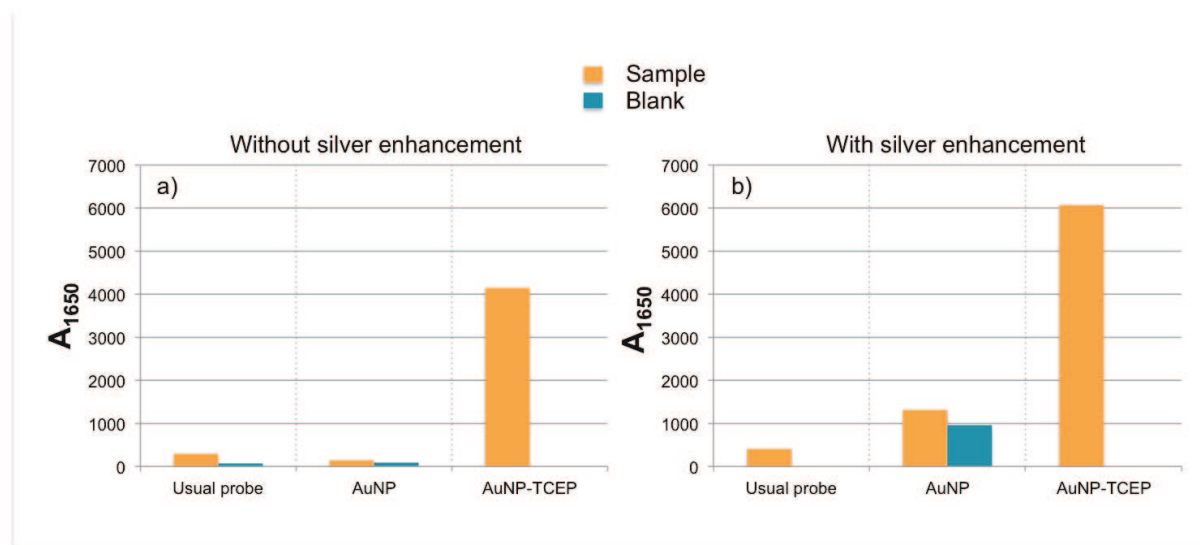


Figure A1 – 3 : Amplification du signal SERRS final par utilisation de nanoparticules d'or greffées. a) sans dépôt d'argent; b) avec dépôt d'argent.

Lorsque l'on remplace la simple sonde de détection par les AuNP, on observe une réduction de l'intensité du signal : l'aire A_{1650} , aire du pic le plus intense caractéristique de la R6G, diminue de presque 50% (**Figure A1 – 3 a**). La fixation des sondes thiolées en surface des particules d'or est inefficace. Lorsque le protocole d'hybridation-SERRS se fait avec les AuNP+TCEP, le signal SERRS est 14 fois plus intense que le signal obtenu avec une sonde

standard (**Figure A1 - 3 a**). La fixation des sondes est donc fortement facilitée par l'introduction d'une étape d'incubation avec du TCEP, plus de 10 fois plus de sondes ont pu être fixées sur les particules d'or. D'autre part, les nanoparticules d'or peuvent concurrencer les surfaces d'argent pour l'adsorption des molécules de R6G. On peut imaginer un repliement des sondes sur elles-mêmes, amenant la molécule de R6G plus proche de la surface d'or que de la surface des particules d'argent. Or, le colloïde d'or n'entraîne pas de signal SERRS de la part de la molécule de R6G à la longueur d'onde d'excitation 514.5 nm (données non présentées). Nous avons donc mimé le principe du dépôt d'argent, ou « silver enhancement ». Plusieurs études récentes utilisent le dépôt d'argent comme moyen de révélation des particules d'or en détection scanométrique (Nam, Stoeva et al. 2004; Thaxton, Hill et al. 2005; Hill, Mirkin et al. 2007). Ces particules sont. Une couche d'argent est déposée sur les particules d'or, trop petites pour être détectées sans cette étape.

Nous allons donc tirer parti de cette technique, et précipiter de l'argent en surface des particules d'or. Ainsi, non seulement la surface des particules d'or ne sera plus disponible pour une adsorption compétitive, mais elle sera de plus recouverte d'une couche de citrate d'argent similaire au colloïde utilisé pour les mesures SERRS. Avant l'étape de lavage des micro-billes magnétiques, nous avons donc prélevé 20 ml de la solution d'hybridation-fixation. Le surnageant est éliminé sur le rack magnétique, et les billes magnétiques sont reprises dans un mélange de 5 μ l d'une solution de nitrate d'argent (2,4 mM) et 10 ml d'une solution de citrate de sodium, 1%. Les particules d'or servent de sites de nucléation pour la réduction du nitrate d'argent par le citrate de sodium, de la même manière que pour la synthèse d'un colloïde d'argent. Après 5 min de réaction, les billes magnétiques sont lavées avec une solution de 2xSSC, puis remises en suspension dans une solution de 4xSSC. Une étape d'élution standard de 20 min à 95°C est alors réalisée, et le signal SERRS de l'éluat est mesuré. Cette étape complémentaire de dépôt d'argent a été menée pour chaque condition

expérimentale (sonde standard, AuNP, AuNP+TCEP) (**Figure A1 - 3 b**). Lors de l'utilisation des AuNP, le signal SERRS final est environ 9 fois plus élevé lorsque l'étape de dépôt d'argent a lieu, mais un signal non spécifique est observé lors des contrôles négatifs. Lors de l'utilisation des AuNP+TCEP, l'étape de silver enhancement entraîne un signal SERRS 1,5 fois plus intense. Le protocole Hybridation-SERRS réalisé avec les AuNP+TCEP et complété par une étape de dépôt d'argent permet donc d'obtenir un signal 20 fois plus élevé que le protocole standard

Ce procédé est prometteur et permettra une efficacité accrue de la méthode en amplifiant le signal final.

Références bibliographiques

- Ding, C. F., Q. Zhang, et al. (2009). "An electrochemical immunoassay for protein based on bio bar code method." *Biosensors & Bioelectronics* **24**(8): 2434-2440.
- Hill, H. D., C. A. Mirkin, et al. (2007). "Nonenzymatic detection of bacterial genomic DNA using the bio bar code assay." *Analytical Chemistry* **79**(23): 9218-9223.
- Lee, P. C. and D. Meisel (1982). "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols." *Journal of Physical Chemistry* **86**(17): 3391-3395.
- Nam, J. M., S. I. Stoeva, et al. (2004). "Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity." *Journal of the American Chemical Society* **126**(19): 5932-5933.
- Storhoff, J. J., R. Elghanian, et al. (1998). "One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes." *Journal of the American Chemical Society* **120**(9): 1959-1964.
- Thaxton, C. S., H. D. Hill, et al. (2005). "A bio-bar-code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release." *Analytical Chemistry* **77**(24): 8174-8178.

ANNEXE 2

I. Introduction

Les SNP, ou Single Nucleotide Polymorphism, sont de simples différences d'une base entre 2 séquences, trouvées chez plus d'1% de la population. Ils peuvent être des marqueurs de l'évolution génétique, par exemple pour l'étude de la domestication des chiens (Ollivier soumis). Les SNPs sont également impliqués dans le développement de maladies sévères telles que le diabète de type 2, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ou certains cancers (Kim and Misra 2007; Bichenkova, Lang et al. 2011), et peuvent également modifier la réponse d'un organisme à un traitement médicamenteux (Kim and Misra 2007).

Les SNP sont détectés par séquençage suivi d'un examen minutieux des séquences (Ollivier soumis), ainsi que par d'autres méthodes enzymatiques également utilisées en routine (Extension de Primers (PEC), clivage enzymatique, ligation ; Bichenkova 2011). Des méthodes de détection non-enzymatiques existent également, notamment la méthode dite d'hybridation, où un oligonucléotide marqué par une molécule fluorescente est hybridé à la séquence d'intérêt. Le signal de fluorescence n'est visible que s'il y a une parfaite hybridation. Une mismatch empêche l'hybridation.

Le SERRS étant plus sensible que la fluorescence (Faulds, Barbagallo et al. 2004; Sabatte, Keir et al. 2008), notre méthode pourrait être adaptée à la détection de SNP. Des méthodes de détection d'ADN par SERS sont déjà parvenues à la détection de mismatches isolées (Cao, Jin et al. 2002; Thompson, Faulds et al. 2010). Notre méthode a le potentiel requis pour des études diagnostiques : elle est rapide, versatile, et permet de trancher facilement quant à la présence de l'ADN cible. Il serait très intéressant d'augmenter la spécificité de la méthode Hybridation-SERRS afin de pouvoir discriminer des séquences qui diffèrent entre elles d'une seule paire de bases (Kim and Misra 2007; Bichenkova, Lang et al. 2011), élargissant ainsi la gamme de diagnostics possibles. Nous avons réalisé des tests préliminaires en étudiant avec

la méthode Hybridation-SERRS des séquences d'ADN simple-brin ne diffèrent que d'1 ou de 2 bases.

II. Système de molécules étudiées

Nous avons étudié un système de 3 molécules d'ADN simple-brin. La molécule cible analysée lors de ces tests est la séquence de 139 bases d'ADN mitochondrial de *Rupicapra rupicapra* déjà étudiée dans le chapitre 3. Deux molécules très proches sont également analysées, qui présentent soit 1 mismatch au niveau de la sonde de détection et 1 mismatch au niveau de la sonde de capture, soit 1 mismatch unique au niveau de la sonde de détection. Ces molécules sont respectivement nommées C₁-D₁ et C₀-D₁. Leurs séquences sont présentées dans le **Tableau A2-1**.

Avant toute optimisation, ces 3 molécules ont été analysées par le protocole Hybridation-SERRS mis au point dans le chapitre 3. Les séquences cibles sont analysées en concentration 5×10^{-8} M (**Figure A2-1**). Si on analyse avec ce protocole les séquences C₀-D₁ et C₁-D₁, le signal SERRS obtenu est légèrement inférieur au signal obtenu pour la molécule cible N, de 0.8% pour C₀-D₁ et de 8.5% pour C₁-D₁ (**Figure A2-1**) ; il ne permet donc pas de différencier les molécules N, C₀-D₁ et C₁-D₁.

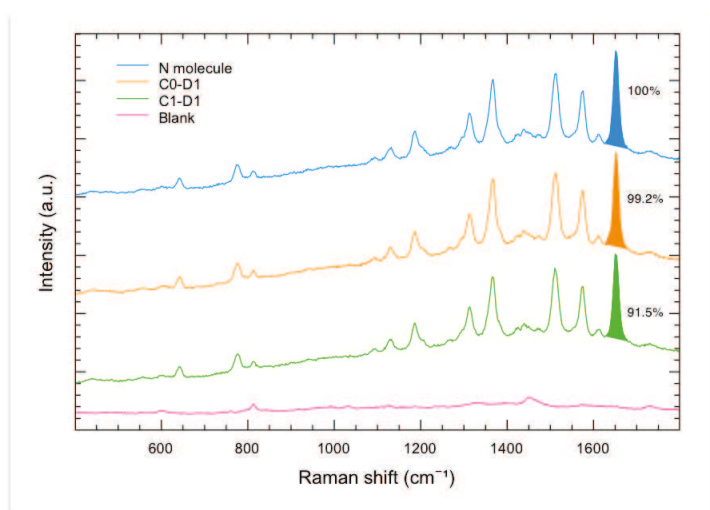


Figure A2-1: Analyse par la méthode Hybridation – SERRS de molécules ne différant que d'une ou 2 bases. La méthode est spécifique de la molécule N, ici en bleu

Tableau A2 – 1 : Séquences utilisées lors des tests d’augmentation de spécificité de la méthode. Les mismatches sont représentées en rouge.

Name	5'-3' Sequence	Length	Mod.
N	GCCATGAAGCACGCACACCCGCCGTCACCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGCTTGGACAAAC	139	-
C₁-D₁ C C	139	-
C₀-D₁ C	139	-
Det. pr.	-----TGTTACGACTTGTCCTCCTTG-----	22	5'-R6G
Capt. pr.	-----GTGTCCTGTATTCACCTTGAGG-----	21	3'-Biotin

Pour les tests suivants les témoins (Blanks) ne sont pas tout à fait plats, et présentent 2 pics assez larges centrés autour de 1573 et de 1643 cm^{-1} . Il ne s'agit pas de contamination, mais d'une contribution provenant de la sonde de capture biotinée, par erreur de purification. Les sondes de capture biotinées, que nous utilisons sont usuellement purifiées par la méthode RP Cartridge Gold, ont été purifiées par la méthode PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis). Le critère utilisé pour une discrimination parfaite dans cette partie ne sera donc pas « absence de signal ». On considèrera comme détectée toute molécule donnant lieu à signal SERRS plus élevé que le signal des témoins auquel on ajoute 3 déviations standards des témoins.

I. Optimisation du protocole

I.1. Influence d'une hausse de température lors de l'étape de lavage

Plus la température d'une solution est élevée, plus l'hybridation des acides nucléiques est spécifique. On peut donc éliminer une partie de l'adsorption aspécifique en augmentant la température.

Nous avons choisi de ne faire varier que le protocole de lavage afin d'évaluer l'effet de la température sur la spécificité de la méthode. Les protocoles d'hybridation, fixation et élution ne varient pas. Les 2 étapes de lavage sont réalisées dans 150 μl de [0.1xSSC, 0.5% Tween20] à température constante de 25°, 30° ou 40° pendant 3 min. Seules les molécules N et C₁-D₁ sont ici analysées. Les résultats sont présentés en **Figure A2-2**.

Après des lavages à température ambiante, les signaux SERRS des molécules N et C₁-D₁ ne diffèrent que de 10 %. Comme vu plus haut, il n'est pas possible de les discriminer efficacement. Une hausse de la température de lavage à 30°C permet d'obtenir une différence de signal SERRS plus importante de 66 %, tout en conservant un fort signal SERRS pour la molécule cible N. Une perte de 18% du signal est toutefois observée.

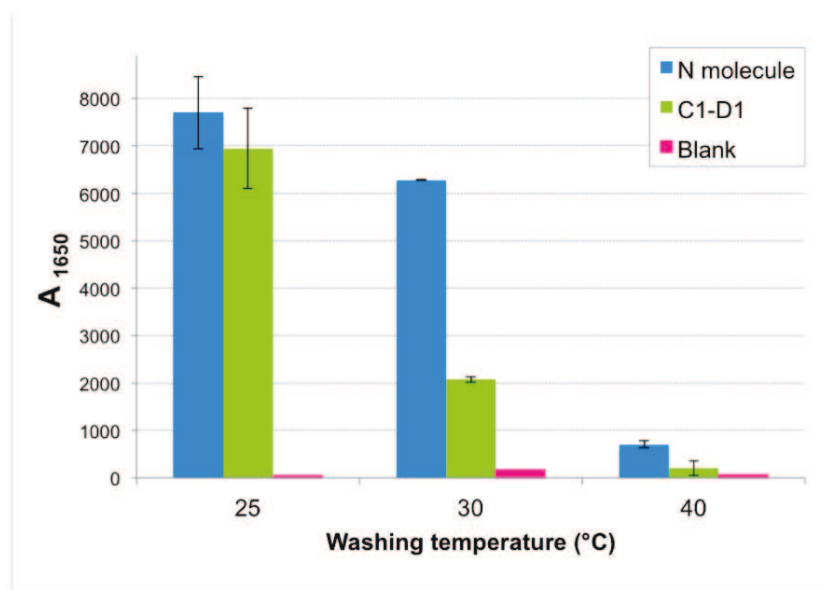


Figure A2-2: Effet d’une hausse de température du milieu de lavage sur la spécificité de la méthode de détection. Les barres d’erreur représentent la déviation standard. (concentration des cibles : 5×10^{-8} M, durée d’acquisition : 30 sec)

Des lavages effectués à 40°C accroissent la différence de signal observée entre le signal de la molécule N et celui de la molécule C₁-D₁, mais entraînent également une perte considérable de signal, même pour la molécule N.

Les lavages à 30°C semblent donc être la meilleure option pour obtenir un signal SERRS suffisamment intense, tout en atteignant une spécificité accrue. Un test de la température de lavage entre 27 et 35° pourrait donner des résultats optimaux.

I.2. Optimisation de la salinité des milieux d’hybridation et de lavage

Nous avons testé différentes combinaisons de milieux d’hybridation et de lavage, afin d’améliorer la spécificité de la méthode de détection. La salinité du milieu d’hybridation a été variée entre 4xSSC et 1xSSC, et celle des milieux de lavages entre 0.1xSSC et 0.025xSSC. La concentration de Tween20 a été maintenue à 0.5%. Les conditions testées ainsi que leur nomenclature sont listées dans le **Tableau A2-2**.

Tableau A2-2: Combinaisons de salinité de milieux d'hybridation et de lavages testées dans cette étude

Hybridation	Lavage	Nomenclature
4xSSC	4xSSC	H4 - L4
	0,1xSSC	H4 - L0.1
	0,05xSSC	H4 - L0.05
	0,025xSSC	H4 - L0.025
2xSSC	0,1xSSC	H2 - L0.1
	0,05xSSC	H2 - L0.5
	0,025xSSC	H2 - L0.025
1xSSC	0,1xSSC	H1 - L0.1
	0,05xSSC	H1 - L0.05
	0,025xSSC	H1 - L0.025

Les résultats Hybridation-SERRS de quelques combinaisons de salinités sont représentés en **Figure A2-3** pour les molécules N et C1-D1.

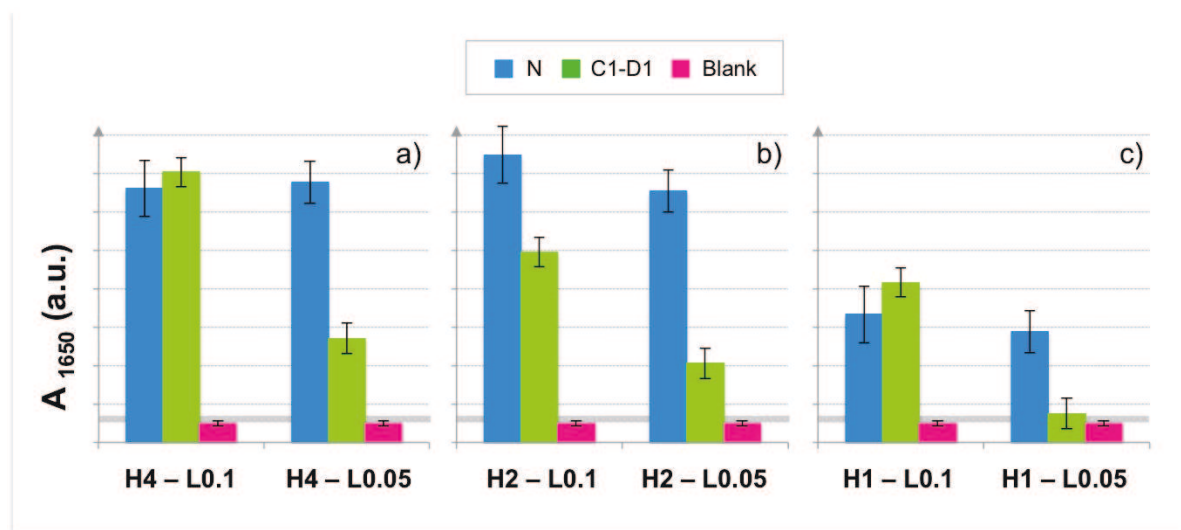


Figure A2-3 : Résultats Hybridation-SERRS obtenus pour quelques combinaisons de salinité a) H4 – L0.1 et - L0.05 b) H2 – L0.1 et - L0.05 et c) H1 – L0.1 et - L0.05. Les résultats ont été normalisés par rapport au signal des blancs. La bande grise représente 3 déviations standard des témoins. Tout signal supérieur à cette limite est positif. Concentration des cibles : 5×10^{-8} M, durée d'acquisition : 30 sec.

Le signal de la molécule N diminue de 50 % lorsque la salinité d'hybridation est divisée par 4 (**Figure A2-3**). Cela indique une diminution de l'efficacité d'hybridation.

Lorsque la salinité du milieu d'hybridation est gardée constante, mais que l'on divise la salinité du milieu de lavage par 2, on observe systématiquement une baisse du signal pour la molécule C₁-D₁, tandis que le signal obtenu pour la molécule cible N ne varie pas significativement. La combinaison H1-L0.05 permet presque de ne détecter que la molécule cible N.

I.3. Augmentation du nombre de lavages

Nous avons envisagé qu'un plus grand nombre de lavages puisse dissocier un maximum de duplexes aspécifiques. Nous avons utilisé pour ce test la combinaison **H2 – L0.025**, avec des salinités des milieux d'hybridation et de lavage de 2xSSC et 0.025xSSC, respectivement. Le nombre de lavages est de deux, effectués à température ambiante afin de n'observer que l'effet du nombre de lavages. Les résultats sont présentés en **Figure A2-4**.

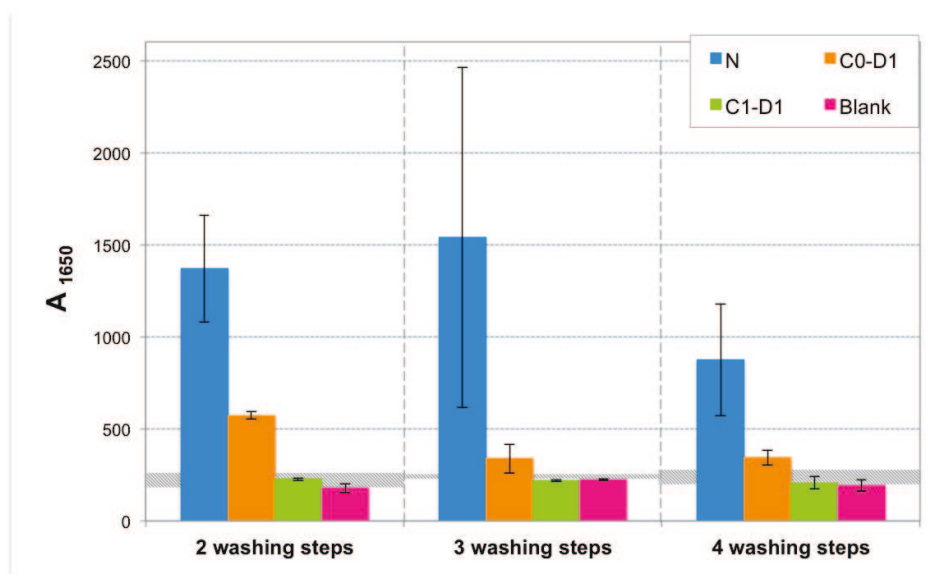


Figure A2-4 : Influence du nombre d'étapes de lavage sur la spécificité de la méthode. Les salinités des milieux d'hybridation et de lavage sont de 2xSSC et 0.025xSSC, respectivement. La bande grise représente 3 déviations standards des témoins ; on considère comme détectées toutes molécules donnant lieu à un signal SERRS plus élevé que cette bande grise. (Concentration des cibles : 5×10^{-8} M, durée d'acquisition : 30 sec).

Quel que soit le nombre de lavages, la molécule C₁-D₁ n'est pas détectée par la méthode. On réussit donc à discriminer des molécules différant de 2 bases, situées respectivement dans la zone d'hybridation de la sonde de capture et de la sonde de détection SERRS. En revanche, la

molécule C₀-D₁ est détectée par notre méthode dans toutes les conditions testées. On note toutefois une plus forte différence entre les molécules N et C₀-D₁ lorsque 3 lavages sont effectués.

Nous sommes donc capables de discriminer 2 séquences très proches présentant 1 mismatch par sonde nucléique, mais pas encore des différences d'une seule base. Cependant, les tests préliminaires réalisés dans l'optique d'une augmentation de la spécificité de la méthode sont très encourageants. En combinant les paramètres salinité, température et nombre de lavages, la méthode SERRS- hybridation développée lors de cette thèse a le potentiel de devenir une méthode de détection des SNP. Elle pourra ainsi être utilisée pour réaliser des diagnostics médicaux (Kim and Misra 2007). On pourra également l'utiliser pour l'étude d'ADN ancien (Ollivier soumis).

Références bibliographiques

- Bichenkova, E. V., Z. L. Lang, et al. (2011). "DNA-mounted self-assembly: New approaches for genomic analysis and SNP detection." *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **1809**(1): 1-23.
- Cao, Y. W. C., R. C. Jin, et al. (2002). "Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection." *Science* **297**(5586): 1536-1540.
- Faulds, K., R. P. Barbagallo, et al. (2004). "SERRS as a more sensitive technique for the detection of labelled oligonucleotides compared to fluorescence." *Analyst* **129**(7): 567-568.
- Kim, S. and A. Misra (2007). "SNP genotyping: Technologies and biomedical applications." *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**: 289-320.
- Ollivier, M., Petit, Hitte, Hughes, Gillet, Duffrais, Pionnier- Capitan, Lagoutte, Arbogast, Balasescu, Boroneant, Mashkour, Tresset, Vigne, Hänni (soumis). "Evidence of coat color variation sheds new light on ancient canids."
- Sabatte, G., R. Keir, et al. (2008). "Comparison of surface-enhanced resonance Raman scattering and fluorescence for detection of a labeled antibody." *Analytical Chemistry* **80**(7): 2351-2356.
- Thompson, D. G., K. Faulds, et al. (2010). "Precise Control of the Assembly of Dye-Coded Oligonucleotide Silver Nanoparticle Conjugates with Single Base Mismatch Discrimination Using Surface Enhanced Resonance Raman Scattering." *Journal of Physical Chemistry C* **114**(16): 7384-7389.

ANNEXE 3

Suppléments pour le manuscrit :

« A SERRS-hybridization assay for the detection of DNA sequences refractory to PCR »

Cécile Feuillie^{# 1}, Maxime Mohamad Merheb^{# 2}, Benjamin Gillet³, Gilles Montagnac¹, Isabelle Daniel¹
and Catherine Hänni²

Co-first author

1: Laboratoire de Géologie de Lyon - Terre Planètes Environnement, UMR 5276, ENS de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

2: Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, UMR 5242, Université Lyon 1, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

3: Plateforme nationale de Paléogénétique PALGENE, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Table S1 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the N₅/N₃ molecule. The N molecule is taken as a reference. PCR amplification primers are removed from the analysis and appear only on the template molecule in red. Differences from the initial molecule are represented in red. For each haplotype sequence, the observed frequency and percentage are given.

		5'3' Sequence	Freq.	%
N		CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
Consensus			
N/N	>1	10	53%
	>2 -	4	21%
	>3 -	1	5%
	>4 - - - -	1	5%
	>5 -	1	5%
	>6 W -	1	5%
	>7 -	1	5%
N/N - independent PCR results	PCR1			
	>1	3	75%
	>3 -	1	25%
	PCR2			
	>1	2	67%
	>2 -	1	33%
	PCR3			
	>1	3	50%
	>2 -	1	17%
	>4 - - - -	1	17%
	>5 -	1	17%
	PCR4			
	>1	2	33%
	>2 -	2	33%
	>6 W -	1	17%
	>7 -	1	17%

In each of the following tables, abasic sites are represented as red stars *. PCR amplification primers are removed from the analysis and appear only on the template molecule in red. Differences from the initial molecule are represented in red. For each haplotype sequence, the observed frequency and percentage are given.

Table S2 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the N₅/I₃ molecule. The N₅ and C_I₃ molecules are taken as a reference. The C_I₃ corresponds to I₃ strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
N	CATGAAGCACGCACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACAGGACA-CTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_I	CATGAAGCACGCACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATAC*GGACA-CTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
Consensus		
N/I	>1 -	15	56%
	>2 - -	1	4%
	>3C. .G	1	4%
	>4 -	1	4%
	>5 -	1	4%
	>6G.	1	4%
	>7T.	1	4%
	>8 - - -	1	4%
	>9 - - - - -	1	4%
	>10 - -	1	4%
	>11T.	1	4%
	>12 - - -	1	4%
	>13C.	1	4%

N/I - independent PCR results		N/I - independent PCR results	
N/I - independent PCR results	PCR1		
	>1	4 57%
	>2--	1 14%
	>3-C...G	1 14%
	>4-	1 14%
	PCR2		
	>1	4 57%
	>5- -	1 14%
	>6-G	1 14%
	>7T	1 14%
	PCR3		
	>1-	2 29%
	>8--	1 14%
>9- - - - -	1 14%	
>10- -	1 14%	
>11-T	1 14%	
>12--	1 14%	
PCR4			
>1-	5 83%	
>13C	1 17%	

Table S3 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the II₅/N₃ molecule. The II₅ and C_N₃ molecules are taken as a reference. The C_N₃ corresponds to N₃ strand in the reverse complementary orientation.

		5'3' Sequence	Freq.	%
	II	CATGAAGCACGCACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAACCT*TTTAAACAC*CCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
	C_N	CATGAAGCACGCACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
	Consensus		
II/N	>1	16	59%
	>2-.....	1	4%
	>3-.....	3	11%
	>4G	2	7%
	>5-.....	3	11%
	>6T.....	1	4%
	>7A.....	1	4%
II/N - independent PCR results	PCR1			
	>1	7	100%
	PCR2			
	>1	1	13%
	>2-.....	1	13%
	>3-.....	3	38%
	>4G	1	13%
	>5-.....	2	25%
	PCR3			
	>1	4	67%
	>4G	1	17%
	>6T.....	1	17%
	PCR4			
	>1	4	67%
	>5-.....	1	17%
	>7A.....	1	17%

Table S4 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the N5'/IV3' molecule. The N5' and C_IV3' molecules are taken as a reference. The C_IV3' corresponds to IV3' strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
N	CATGAAGCACGCACACCCGCCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_IV	CATGAAGCACGCACACCCGCCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACA*GACACTCA*AACCTATT*AAACACAC*AATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
Consensus		
N/V	>1	12	55%
	>2	1	5%
	>3	1	5%
	>4	1	5%
	>5	1	5%
	>6	1	5%
	>7	1	5%
	>8	2	9%
	>9	1	5%
	>10	1	5%
	>1	3	50%
	>2	1	17%
	>3	1	17%
	>4	1	17%
	>1	3	75%
	>5	1	25%
	>1	3	75%
	>6	1	25%
	>1	3	38%
	>7	1	13%
	>8	2	25%
	>9	1	13%
	>10	1	13%

Table S5 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the V₅/N₃ molecule. The V₅ and C_N₃ molecules are taken as a reference. The C_N₃ corresponds to N₃ strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
V	CATGAAGCACGCACACCCGCCGTCACCCTCCTCAAGTGAA*ACAGGACA*TCAAAACC*ATTTAAAC*CACCAATC*CACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_N	CATGAAGCACGCACACCCGCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
Consensus		
V/N	>1	12	44%
	>2 -	1	4%
	>3 -	1	4%
	>4 -	1	4%
	>5 G	1	4%
	>6 -	1	4%
	>7 -	2	7%
	>8 -	2	7%
	>9 -	3	11%
	>10 -	1	4%
	>11 -	1	4%
	>12 A	1	4%

V/N - independant PCR results			
V/N - independant PCR results	PCR1		
	>1	4 67%
	>2-.....	1 17%
	>3-.....	1 17%
	PCR2		
	>1	2 29%
	>4-.....	1 14%
	>5G.....	1 14%
	>6-.....	1 14%
	>7-.....	1 14%
	>8-.....	1 14%
	PCR3		
	>1	2 25%
	>7-.....	1 13%
	>9-.....	3 38%
	>10-.....	1 13%
>11-.....	1 13%	
PCR4			
>1	4 67%	
>8-.....	1 17%	
>12A.....	1 17%	

Table S6 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the I₅/I₃ molecule. The I₅' and C_I₃' molecules are taken as a reference. The C_I₃' corresponds to I₃' strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
I	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCTATTAAACAC*CCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_I	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATAC*GGACACTCAAAACCTATTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
I/I	>1 - - - - - - - - - -	1	4%
	>2 - - - - - -	1	4%
	>3 - -	1	4%
	>4 - - - - - TC	1	4%
	>5 C . - - - - -	1	4%
	>6 C	1	4%
	>7 - G	1	4%
	>8 - - - - -	1	4%
	>9 - - - - -	1	4%
	>10 -	2	8%
	>11 - - - - -	1	4%
	>12 - - - - -	1	4%
	>13 -	1	4%
	>14 - - - - -	1	4%
	>15 - -	1	4%
	>16 - - - - -	1	4%
	>17 - . C	1	4%
	>18 - - - - -	1	4%
	>19 - - - - -	1	4%
	>20 - - - - -	1	4%
	>21 - - - - -	1	4%
	>22 - - - - -	1	4%
	>23 - - - - -	1	4%
	>24 - - - - -	1	4%

Table S6 (suite)

I/I - independant PCR results	PCR1			
	>1-.....-.....	1	14%
	>2-.....	1	14%
	>3--.....	1	14%
	>4-----TC.....	1	14%
	>5C-----.....	1	14%
	>6C.....	1	14%
	>7-.....G.....	1	14%
	PCR2			
	>8-.....	1	14%
	>9-.....	1	14%
	>10-.....	2	29%
	>11-.....	1	14%
	>12-.....	1	14%
	>13-.....	1	14%
	PCR3			
	>14-.....	1	17%
	>15-.....	1	17%
	>16-.....	1	17%
	>17-C.....	1	17%
	>18-.....	1	17%
	>19-.....	1	17%
	PCR4			
	>20-.....	1	20%
	>21-.....	1	20%
	>22-.....	1	20%
	>23-.....	1	20%
	>24-.....	1	20%

Table S7 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the II₅/I₃ molecule. The II₅' and C_I₃' molecules are taken as a reference. The C_I₃' corresponds to I₃' strand in the reverse complementary orientation.

		5'3' Sequence	Freq.	%
	II	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCT*TTTAAACAC*CCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
	C_I	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATAC*GGACACTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
II/I	>1-.....	1	5%
	>2-.....	1	5%
	>3-.....	1	5%
	>4-.....	1	5%
	>5-.....	1	5%
	>6-.....	1	5%
	>7-.....	1	5%
	>8-.....	3	14%
	>9-.....A	1	5%
	>10C.....-.....	1	5%
	>11-.....	1	5%
	>12T.....C.....-.....	1	5%
	>13-.....	2	10%
	>14-.....	1	5%
	>15-.....	1	5%
	>16-.....T.....G.....	1	5%
	>17-.....	1	5%
	>18-.....	1	5%

III/I - independent PCR results			
PCR1	>1		1 17%
	>2		1 17%
	>3		1 17%
	>4		1 17%
	>5		1 17%
	>6		1 17%
	PCR2	>7	
>8			1 25%
>9			1 25%
>10			1 25%
PCR3		>8	
	>11		1 25%
	>12		1 25%
PCR4	>13		2 29%
	>14		1 14%
	>15		1 14%
	>16		1 14%
	>17		1 14%
	>18		1 14%

Table S8 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the I_5/IV_3 molecule. The I_5 and $C IV_3$ molecules are taken as a reference. The $C IV_3$ corresponds to IV_3 strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
I	CATGAAGCAGCACACACCGCCGTCAC-CCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCTATTTAAACAC*CCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_IV	CATGAAGCAGCACACACACCGCCGTCAC-CCTCCTCAAGTGAATACA*GACACTCA*AACCTATT*AAACACAC*AATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
I/IV	>1 --.....T	1	5%
	>2C.-	5	23%
	>3- - - - -	1	5%
	>4- - - - -	1	5%
	>5T	1	5%
	>6C.....C.-	1	5%
	>7- - - - -	1	5%
	>8 ..A..- - - - -	1	5%
	>9- - - - -	1	5%
	>10-AT..- - - - -	1	5%
	>11-C.-	1	5%
	>12- - - - -	1	5%
	>13- - - - -	1	5%
	>14- - - - -	1	5%
	>15- - - - -	1	5%
	>16 ..T.-.....G.	1	5%
	>17- - - - -	1	5%
	>18- - - - -	1	5%

Table S8 (suite)

I/V - independant PCR results	PCR1			
	>1	--.....T.	1	17%
	>2C.-	2	33%
	>3- - - - -	1	17%
	>4- - - - -	1	17%
	>5T.	1	17%
	PCR2			
	>2C.-	2	33%
	>6C.-	1	17%
	>7- - - - -	1	17%
	>8	..A.- - - - -	1	17%
	>9- - - - -	1	17%
	PCR3			
	>2C.-	1	17%
	>10AT.- - - - -	1	17%
	>11-C.-	1	17%
	>12- - - - -	1	17%
	>13- - - - -	1	17%
	>14- - - - -	1	17%
	PCR4			
	>15- - - - -	1	25%
	>16	..T.- - - - -G.	1	25%
	>17- - - - -	1	25%
	>18- - - - -	1	25%

Table S9 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the V₅/I₃ molecule. The V₅ and C_I₃ molecules are taken as a reference. The C_I₃ corresponds to I₃ strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
V	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAA*ACAGGACA*TCAAAACC*ATTAAAC*CACCAATC*CACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_I	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATAC*GGACACTCAAAACCTATTTAAACACACCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
V/I	>1--.....	1	5%
	>2-.....	2	11%
	>3--.....	2	11%
	>4-.....	1	5%
	>5--.....	1	5%
	>6-.....	1	5%
	>7--.....	1	5%
	>8-.....A.....	1	5%
	>9-.....	1	5%
	>10-.....	1	5%
	>11-C.G.....	1	5%
	>12-.....	1	5%
	>13-.....	1	5%
	>14C.....-.....	1	5%
	>15C.....-.....	1	5%
	>16-.....	1	5%
	>17-.....	1	5%

Table S9 (suite)

V/I - independant PCR results	PCR1			
	>1-.....	1	25%
	>2-.....	2	50%
	>3--.....	1	25%
	PCR2			
	>4-.....	1	17%
	>5-.....	1	17%
	>6-.....	1	17%
	>7-.....	1	17%
	>8-.....A.....	1	17%
	>9-.....	1	17%
	PCR3			
	>3-.....	1	20%
	>10-.....	1	20%
	>11-C.G.....	1	20%
	>12-.....	1	20%
	>13-.....	1	20%
	PCR4			
	>14	...C.....-.....	1	25%
	>15C.....-.....	1	25%
	>16-.....	1	25%
	>17-.....	1	25%

Table S10 : Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the II₅/IV₃ molecule. The II₅ and C_IV₃ molecules are taken as a reference. The C_IV₃ corresponds to IV₃ strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
II	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACAGGACACTCAAAACCT*TTTAAACAC*CCAATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_IV	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTGAATACA*GACACTCA*AACCTATT*AAACACAC*AATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
II/IV	>1-.....A.....	1	4%
	>2G.....	1	4%
	>3-.....	1	4%
	>4-.....	2	8%
	>5-.....	1	4%
	>6-.....	1	4%
	>7-.....	1	4%
	>8-.....	1	4%
	>9-.....	1	4%
	>10 T.....-.....	1	4%
	>11-.....	1	4%
	>12A.....-.....	1	4%
	>13T-.....	1	4%
	>14-.....	1	4%
	>15-.....	1	4%
	>16-.....	1	4%
	>17-.....	1	4%
	>18-.....	1	4%
	>19-.....	1	4%
	>20-.....	1	4%
	>21A.....	1	4%
	>22-.....	1	4%
	>23-.....	1	4%

Table S10 (suite)

II/IV - independant PCR results	PCR1			
	>1-.....A.....	1	17%
	>2G.....	1	17%
	>3	-.....	1	17%
	>4-.....	1	17%
	>5-.....	1	17%
	>6-.....	1	17%
	PCR2			
	>7	...-.....	1	20%
	>8-.....	1	20%
	>9-.....	1	20%
	>10	T.....	1	20%
	>11-.....	1	20%
	PCR3			
	>4-.....	1	17%
	>12A.....-.....	1	17%
	>13T.....	1	17%
	>14-.....	1	17%
	>15-.....	1	17%
	>16-.....	1	17%
	PCR4			
	>17-.....	1	14%
	>18-.....	1	14%
	>19-.....	1	14%
	>20-.....	1	14%
	>21-.....A.....	1	14%
	>22-.....	1	14%
	>23-.....	1	14%

Table S11: Alignment of the sequences obtained from cloning-sequencing for the PCR amplification of the V₅/IV₃ molecule. The V₅ and C_IV₃ molecules are taken as a reference. The C_IV₃ corresponds to IV₃ strand in the reverse complementary orientation.

	5'3' Sequence	Freq.	%
V	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAA*ACAGGACA*TCAAAACC*ATTTAAAC*CACCAATC*CACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
C_IV	CATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTGAATACA*GACACTCA*AACCTATT*AAACACAC*AATCACACAAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACA		
V/IV	>1 -.....	3	13%
	>2 GT..... -.....	1	4%
	>3 -.....	1	4%
	>4 .. -.....	1	4%
	>5 T..... -.....	1	4%
	>6 ... -.....	1	4%
	>7 -.....	1	4%
	>8 -.....	2	9%
	>9 -.....	1	4%
	>10 -.....	1	4%
	>11 -.....	1	4%
	>12 -.....	1	4%
	>13 -.....	1	4%
	>14 -.....	1	4%
	>15 .. -.....	1	4%
	>16 -T.....	1	4%
	>17 T-.....	1	4%
	>18 -.....	1	4%
	>19 -.....	1	4%
	>20 TA-.....	1	4%

Table S11 (suite)

V/IV - independant PCR results	PCR1			
	>1- - - - -	2	33%
	>2GT.....-	1	17%
	>3- - - - -	1	17%
	>4	..- - - - -	1	17%
	>5	T.....- - - - -	1	17%
	PCR2			
	>6	..- - - - -	1	17%
	>7- - - - -	1	17%
	>8- - - - -	1	17%
	>9	- - - - -	1	17%
	>10- - - - -	1	17%
	>11	- - - - -	1	17%
	PCR3			
	>1- - - - -	1	25%
	>12- - - - -	1	25%
	>13- - - - -	1	25%
	>14	- - - - -	1	25%
	PCR4			
	>8- - - - -	1	14%
	>15	..- - - - -	1	14%
	>16- - - - -T	1	14%
	>17T- - - - -	1	14%
	>18- - - - -	1	14%
	>19- - - - -	1	14%
	>20TA- - - - -	1	14%

PARTIE 2

Chapitre 1

Introduction

I. Evidences de vie passée et chronologie de la vie

I.1. Traceurs utilisés

Qu'elles soient morphologiques, moléculaires ou isotopiques, les traces de Vie conservées dans le registre fossile sont des preuves de vie passée, ou biosignatures.

I.1.1. Fossiles morphologiques

Les fossiles morphologiques sont des restes d'organismes, des moulages ou des empreintes attestant de la présence de vie passée. On distingue les fossiles morphologiques selon leur taille. Os, dents, exosquelettes, moulages d'organismes variés, empreintes de pas/de mouvements (Vannier, Calandra et al. 2010), coprolithes, etc, tous les fossiles de taille centimétrique ou supérieure sont appelés **macrofossiles**. Les fossiles de taille millimétrique ou inférieure, restes de foraminifères, diatomées, ou bactéries et archées, sont appelés **microfossiles**. Ces derniers sont tout particulièrement importants dans l'étude des origines de la Vie, car les premiers organismes étaient vraisemblablement unicellulaires. De nombreuses technologies permettent d'imager les microfossiles et d'étudier leur composition chimique en 2 et 3 dimensions : microscopie optique et électronique à transmission et à balayage (Javaux, Marshall et al. 2010), spectroscopie Raman (Schopf and Kudryavtsev 2005) ou fluorescence X, par exemple (Lemelle, Labrot et al. 2008) (**Figure I – 1**). On peut notamment montrer la présence de matière organique dans les parois cellulaires : Schopf (2005) utilise la bande Raman G caractéristique du kérogène.

Les stromatolithes, ou structures biosédimentaires laminées associées à des tapis microbiens, sont également l'objet de nombreuses études. Les stromatolithes modernes sont en effet

biogéniques, et il est donc envisageable de trouver des cellules fossiles dans les stromatolithes fossiles. Les plus vieux datent de 3.43 Ga à l'Archéen (craton de Pilbara, Australie) (Allwood and Anderson 2009). Toutefois, aucun microfossile n'y a été identifié à ce jour.

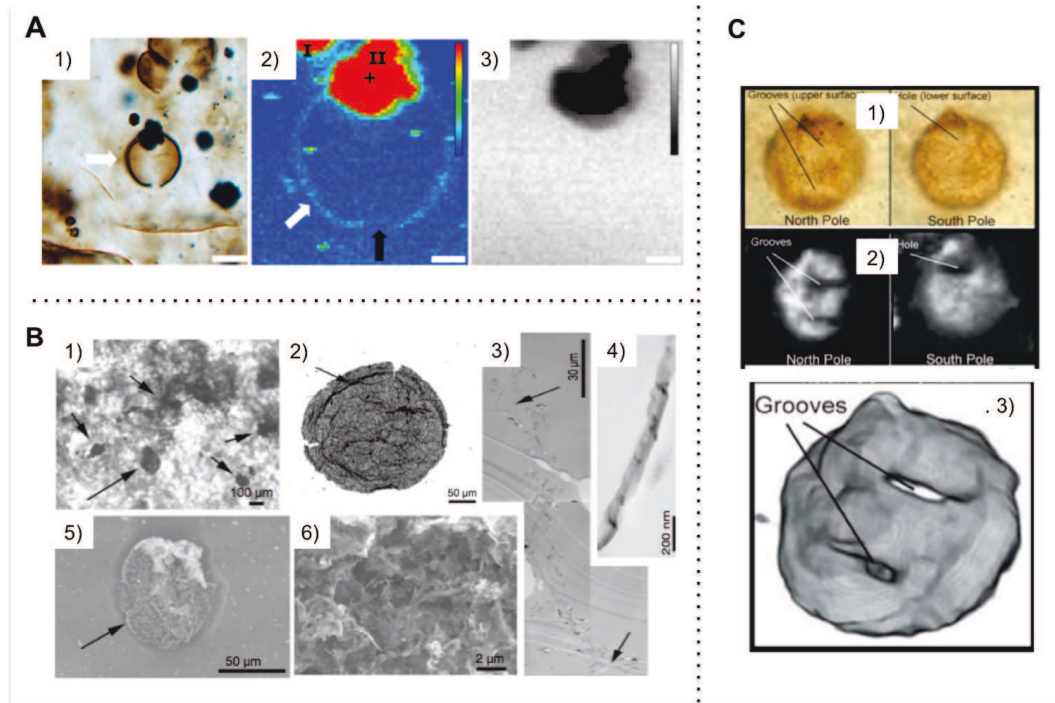


Figure I – 1 : Exemples de microfossiles A) Microfossiles de *Myxococcoides chlorelloidea* dans le conglomérat de Draken daté de 700-800 Ma imagés par fluorescence X (Lemelle et al, 2008). 1 : image microscope optique ; 2 et 3 : cartes de fluorescence à 2,45 keV représentant la distribution (2) du Soufre (cristal de pyrite en rouge, murs cellulaires en bleu clair) et (3) du Si (murs cellulaires appauvris) ; B) Microstructures carbonnées dans des marnes mésoarchéennes (3.2 Ga) observées en microscope optique à transmission (1 et 2), microscopie électronique à transmission (3 et 4) et microscopie électronique à balayage (mode backscattering) (5 et 6) (Javaux et al, 2010). C) Cellule provenant d'un stromatolithe datant de 650 Ma (Chichkan, Kazakhstan) imagée par 1) microscopie optique, 2) et 3) spectroscopie Raman 2D et 3D (réalisés selon l'intensité de la bande G du kérogène)(Schopf et al, 2005).

Les stromatolithes les plus anciens d'origine biologique avérée datent de **2.7 Ga** et proviennent de la région de Tumbiana (groupe de Fortescue, Australie) (Lepot, Benzerara et al. 2008). Des globules organiques semblables à des cellules ont été observés et analysés par nanospectroscopie, montrant des similitudes avec des cellules bactériennes actuelles.

Des traces plus anciennes ont été rapportées, en particulier des filaments pyriteux dans des dépôts de sulfures hydrothermaux du craton de Pilbara datés de **3.23 Ga** (Rasmussen 2000).

Ces filaments pourraient être des restes de microorganismes. Des objets fossiles dont la morphologie rappelle celle des microorganismes ont également été observées dans les cherts de la formation de l'Apex (craton de Pilbara, Australie) datée de **3,46 Ga** (Schopf, Kudryavtsev et al. 2007) (**Figure I – 2 a**). Cependant, leur biogénicité est sujette à controverse, car il est possible de produire de façon abiotique des structures géométriques ayant des formes filamenteuses ou sphériques, typiques de cellules bactériennes, par des processus hydrothermaux, par exemple (Brasier, Green et al. 2002; Brasier, Green et al. 2004). Ces traces morphologiques ne sont donc que des microfossiles présumés.

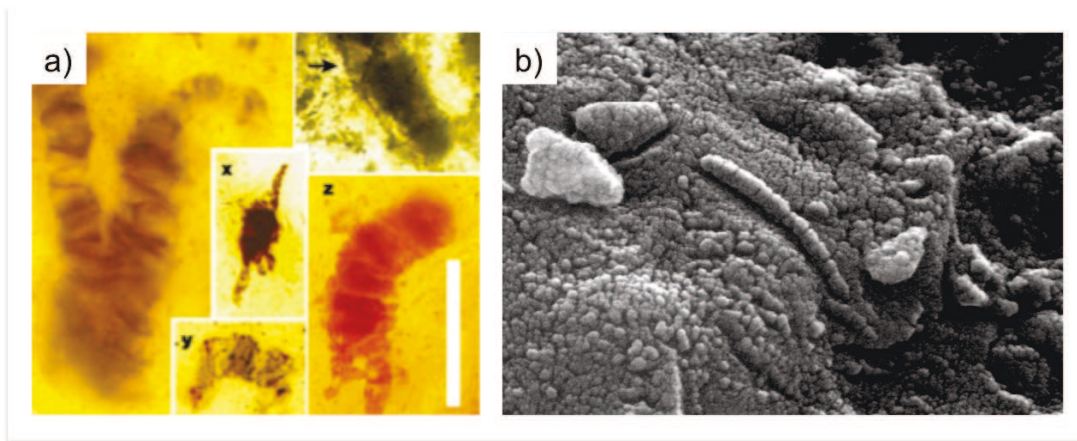


Figure I - 2 : a) Microfossiles « présumés » trouvés dans les cherts de l'Apex (3,465 Ga) (d'après Brasier et al., 2002) ; b) Globules de carbonates observés par McKay (1996) dans la météorite ALH 84001.

La découverte de globules de carbonates dans la météorite martienne ALH 84001 par McKay (1996) a lancé un débat houleux sur la présence supposée de microfossiles dans les météorites et comètes (**Figure I – 2 b**). Ces carbonates, datées entre 3.90 et 4.04 Ga (Borg, Connelly et al. 1999) auraient aussi bien pu se former de façon abiotique dans les eaux hydrothermales par exemple, ou encore par métamorphisme de choc (Borg, Connelly et al. 1999; Treiman, Amundsen et al. 2002; Treiman 2003). Quelques groupes continuent de poursuivre l'hypothèse de la présence de microfossiles dans les météorites (Hoover 2008), sans toutefois apporter de preuves irréfutables.

I.1.2.Fossiles moléculaires (biomarqueurs)

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, après la mort d'un organisme des molécules organiques spécifiques peuvent être conservées, à quelques dégradations près, et former une « biosignature » des formes de vie passées. Le contenu en lipides, protéines et acides nucléiques d'un échantillon fossile renseigne donc sur l'état de la biosphère. A ce jour, la biosignature moléculaire avérée la plus ancienne provient de l'analyse des roches de la formation de Barney Creek (Australie), datées de **1.64 Ga**, où des caroténoïdes ont permis d'identifier l'existence passée des bactéries sulfo-oxydantes pourpres *Chromatiaceae* et vertes *Chlorobiaceae* (Brocks, Love et al. 2005).

I.1.3.Signatures isotopiques

Les organismes vivants utilisent en priorité les isotopes légers. Les structures biologiques présentent donc un fractionnement isotopique, elles sont appauvries en isotopes lourds, ce qui est exprimé par des valeurs de δ négatives (Schidlowski 2001). Les roches anciennes ont souvent subi un métamorphisme qui a affecté les structures morphologiques, mais la signature isotopique peut avoir subsisté.

Plusieurs éléments utilisés par les organismes vivants sont considérés : l'azote N (van Zuilen, Mathew et al. 2005), le soufre S (Ohmoto, Watanabe et al. 2006), le fer Fe (Dauphas, van Zuilen et al. 2004) et surtout le carbone C, qui a permis d'identifier les plus anciennes traces possibles de vie (**Figure I – 3**). Mojzsis et al. (1996) comparent par exemple les signatures isotopiques d'inclusions carbonées dans des grains d'apatite provenant de roches du craton de Pilbara (>3.25 Ga), d'Isua (Groënland ; 3.8 Ga) et de l'île d'Akilia (Groënland ; 3.85 Ga ou plus). Ces inclusions ont des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ très négatives allant jusqu'à -37 ‰ pour l'île d'Akilia. De tels fractionnements ne peuvent a priori être expliqués que par la présence de vie lors de la formation du minéral.

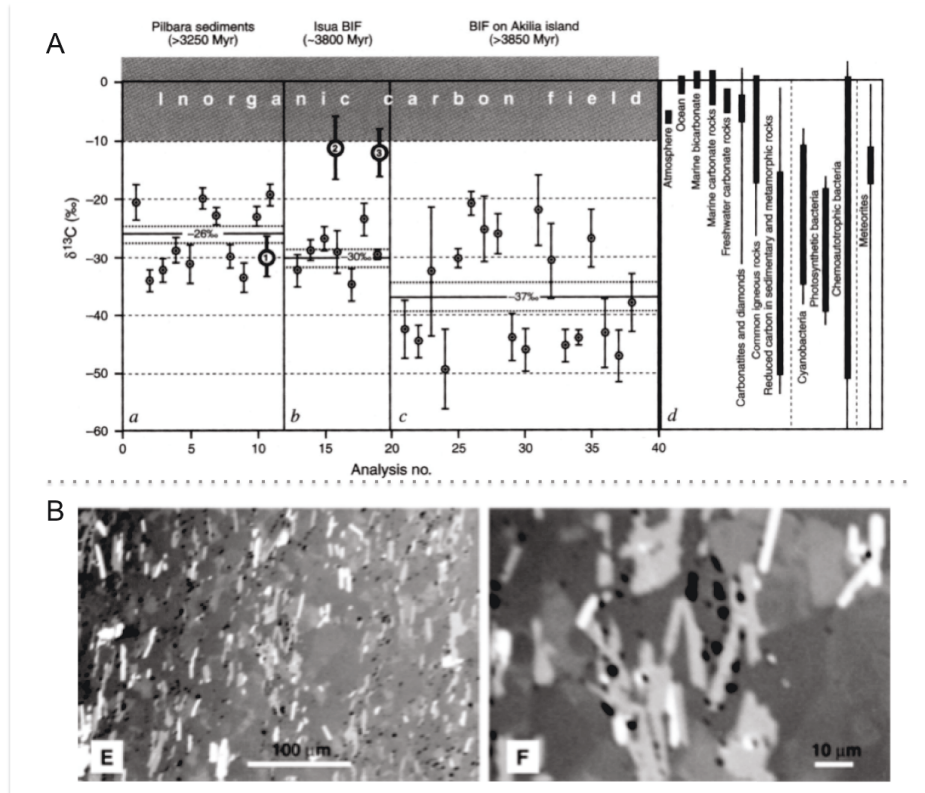


Figure I – 3 : **A)** Compositions isotopiques d'inclusions d'apatite dans les **a.** roches sédimentaires de Roebourne, craton de Pilbara, Australie, > 3.25 Ga ; **b.** BIF d'Isua , Groënland, > 3.7 Ga ; **c.** BIF de l'île d'Akilia, Groënland, > 3.8 Ga ; **d.** Variations isotopiques du carbone dans la nature (extrait de Mojzsis et al., 1996) ; **B)** Images de microscopie électronique à balayage en mode électrons rétrodiffusés des roches sédimentaires d'Isua analysées par Rosing et al. (1999). Les globules de graphite sont en noir.

Rosing et al. (1999) étudient des globules de graphite appauvris en ^{13}C , dans des roches sédimentaires datées de plus 3.7 Ga, provenant d'Isua, au Groënland. Ces particules carbonées présentent une signature isotopique négative avec un $\delta^{13}\text{C}$ de -19‰ et pourraient donc provenir d'organismes planctoniques par exemple. Une seconde hypothèse a été proposée par Van Zuilen et al. (2003) quant à l'origine des carbonates dans les roches d'Isua. Ils pourraient provenir de la décomposition thermique de sidérite selon la réaction $6\text{FeCO}_3 = 2\text{Fe}_3\text{O}_4 + 5\text{CO}_2 + \text{C}$.

I.2. Chronologie établie

Les traces de vie décrites ci-dessus permettent de construire la chronologie de l'apparition de la vie dans les premiers milliards d'années de la planète Terre (**Figure I – 4**). Nous considérons uniquement les plus anciennes traces de vie.

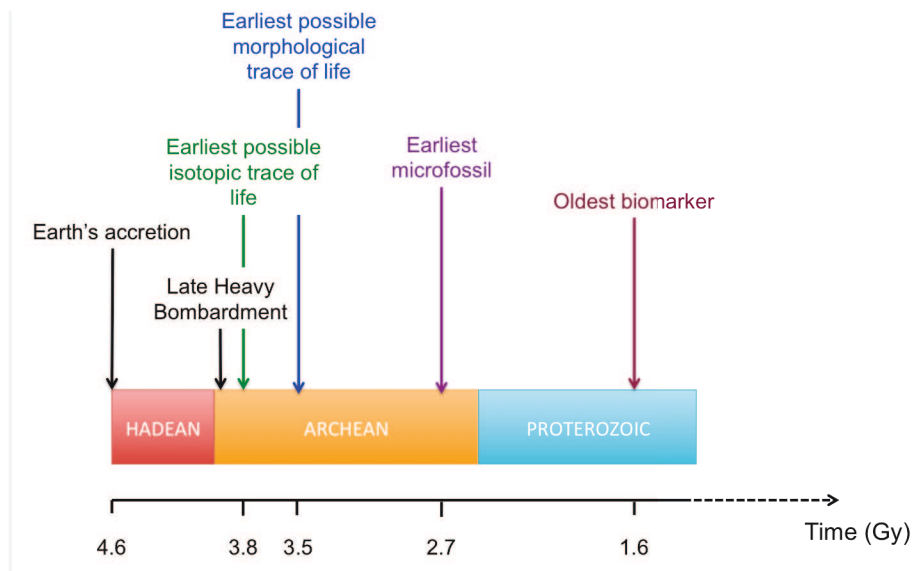


Figure I – 4 : Chronologie des premiers milliards d'années de la Terre. Les plus anciennes traces de vie sont marquées par des flèches. (Patterson 1956; Mojzsis, Arrhenius et al. 1996; Rosing 1999; Brasier, Green et al. 2002; Brocks, Love et al. 2005; Schopf, Kudryavtsev et al. 2007; Lepot, Benzerara et al. 2008)

Même si le fort bombardement météoritique tardif (3.9 – 3.8 Ga) (Mojzsis, Arrhenius et al. 1996) a éventuellement stérilisé la Terre et pourrait être considéré comme la limite temporelle supérieure pour l'origine de la Vie, la Vie a pu apparaître avant le bombardement tardif, et pourquoi pas subsister dans certaines niches, en profondeur par exemple.

La période à considérer pour mener des études sur l'origine de la Vie est donc le début de l'Archéen, voire la fin de l'Hadéen.

I.3. Hypothèses les plus fortes concernant l'origine de la vie

I.3.1. Panspermie

L'hypothèse de panspermie stipule que la première forme de vie aurait été formée sur un autre corps planétaire. La Terre aurait été fertilisée par un impact de météorite/comète. En effet, des molécules organiques ont été et sont apportées sur Terre par des météorites et comètes,

comme la météorite de Murchison (Ehrenfreund and Charnley 2000), par exemple, mais aucune preuve concluante n'a été apportée quant à l'apport de cellules vivantes. L'étude systématique de l'influence des paramètres pression, température, chimie, oxydo-réduction, dynamique, irradiation... permettra d'identifier un ou plusieurs contextes, terrestres ou extra-terrestres, permettant d'initier une forme de vie.

1.3.2. Métabolisme ou réplication ?

La communauté scientifique des exobiologistes est globalement divisée en 2 groupes. Certains considèrent que le métabolisme est apparu en premier, d'autres que c'est la génétique et donc la réplication. La théorie « génétique » repose sur la présence d'un polymère porteur d'information et capable de réplication. La théorie « métabolique » considère que l'apparition d'un tel polymère nécessite au préalable l'accumulation de molécules provenant d'un métabolisme simple (Shapiro 2000; Anet 2004). Ce métabolisme serait un ensemble de réactions spontanées et/ou catalysées par des molécules et ions inorganiques ou des surfaces solides comme les surfaces minérales. Le travail de Russel et Hall (1997) est un bon exemple de la théorie métabolique : en contexte hydrothermal, des surfaces de FeS auraient servi de surface de catalyse favorisant la synthèse de molécules organiques par hydrogénation et carboxylation de précurseurs hydrothermaux (**Figure I - 5**).

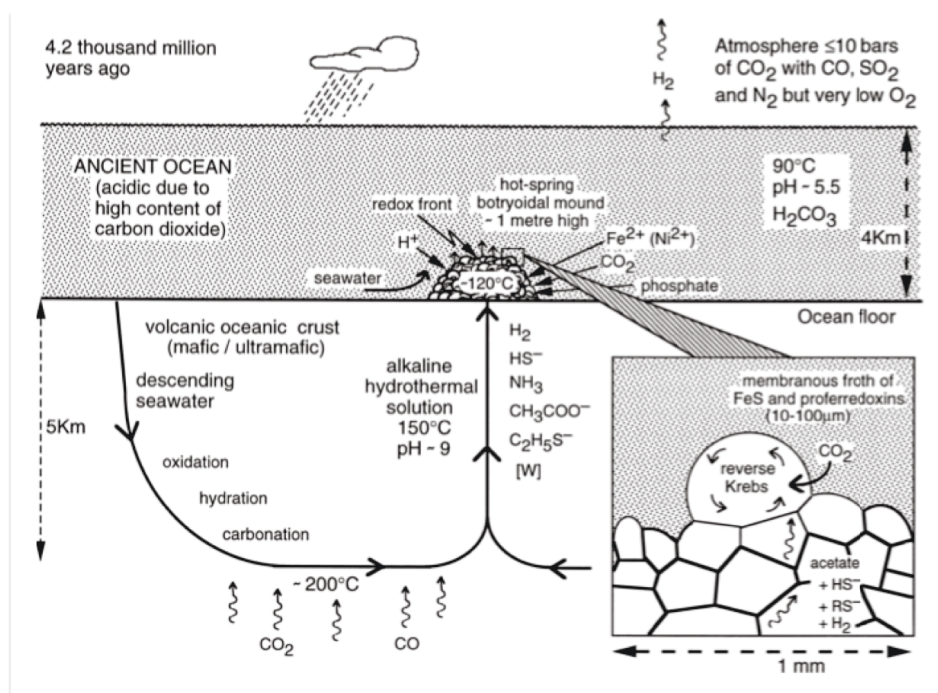


Figure I – 5 : Environnement Hadéen modèle d'après Russell et al. (1997). En contexte hydrothermal, les surfaces de FeS produites servent de catalyseur à de nombreuses synthèses organiques, notamment les réactions de Fischer Tropsch.

La question de savoir si le métabolisme est apparu avant la génétique ou vice versa dépasse toutefois le cadre de mon travail de thèse et je n'en discuterai pas d'avantage.

1.3.3. Monde ARN

Il est admis que le monde actuel où 2 types de polymères génétiques, ADN et ARN, coexistent et collaborent a été précédé par un monde plus simple avec 1 unique polymère génétique. L'ARN adopte des configurations spatiales complexes, lui conférant une activité catalytique semblable aux enzymes (Cech 1988; Altman, Baer et al. 1989; Leu, Obermayer et al. 2011). On parle alors de ribozyme. L'ARN a également la capacité de s'auto-répliquer (Ma and Yu 2006). L'ARN aurait donc pu jouer à la fois le rôle de matériel génétique et de catalyseur (Gilbert 1986; Forterre 2005). Par la suite, le monde ARN aurait effectué une transition vers un monde ADN-ARN (Leu, Obermayer et al. 2011). L'ADN est en effet plus stable que l'ARN et permet de stocker d'avantage d'information car le taux d'erreur lors de la réplication de l'ADN est moins élevé que pour celle de l'ARN.

L'ARN pourrait avoir été précédé par un autre polymère informatif, notamment par l'ANP, ou acide nucléique peptidique. Cet analogue de l'ADN/ARN possède un squelette peptidique remplaçant le squelette [phosphate + ribose] (**Figure I – 6**).

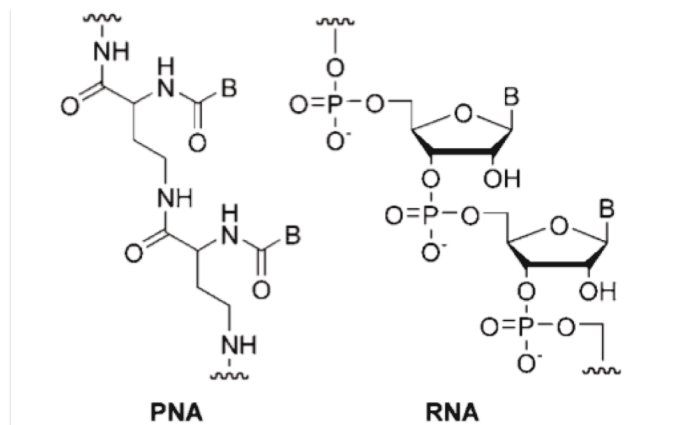


Figure I - 6 : Comparaison entre une molécule de ANP (ici 2,4 diaminobutanoic ANP) et une molécule d'ARN. B = base azotée. (Strasdeit 2005)) (PNA = Peptidic nucleic acid)

L'ANP est un précurseur de l'ARN (Nelson, Levy et al. 2000), et les monomères d'ANP pourraient s'être formés dans la soupe prébiotique (Nielsen 1993). Des molécules d'ANP pourraient avoir précédé les molécules d'ARN, et avoir servi de guide (template) à leur formation (Bohler, Nielsen et al. 1995). Récemment, des di-amino acides ont été détectés dans la météorite de Murchison. Or, ces molécules ont été proposées comme squelette des molécules d'ANP (Strasdeit 2005). Les acides aminés sont de plus les molécules les plus facilement synthétisées lors des expériences d'analogue de chimie prébiotique. Par conséquent, l'hypothèse d'un hybride peptide/acide nucléique apparaît séduisante (Pascal 2006).

II. Contexte environnemental à l'Hadéen/Archéen : une Terre habitable ?

II.1. Activité géologique à l'Hadéen/Archéen

Les enveloppes terrestres qui nous intéressent dans le contexte de l'origine de la vie sont les plus superficielles, à savoir atmosphère, océan, et croûte continentale ou océanique.

II.1.1. Présence précoce de continents

Les roches témoins de l'Hadéen/Archéen ne sont pas nombreuses. Les roches les plus anciennes datent de 3.8 Ga (Isua et Akilia, Groënland) (Mojzsis, Arrhenius et al. 1996; Rosing 1999) ou de 4.03 Ga (orthogneiss d'Acasta, craton des Esclaves, Canada) (Bowring 1999). La croûte continentale aurait donc été présente à 4.03 Ga. Il existe des témoins plus anciens de croûte continentale, les zircons. Ce minéral est particulièrement résistant, et des zircons Archéens et même Hadéens, ont été analysés. Dans les métaconglomérats de Jack Hills (Gneiss de Narryer, Craton de Yilgarn, Australie), on trouve des zircons détritiques datés de plus de 4.1 Ga, dont un grain dont l'âge daté à 4.404 Ga (± 8 Ma) (Mojzsis, Harrison et al. 2001; Wilde, Valley et al. 2001). La composition en terres rares ainsi que la composition isotopique en oxygène des zircons indiquent qu'ils proviennent d'un magma granitique. De plus, la composition isotopique en Hf de ces zircons indiquent un appauvrissement précoce du manteau supérieur, cohérent avec une formation de croûte continentale dès 4.4 – 4.5 Ga (Harrison, Blichert-Toft et al. 2005; Blichert-Toft and Albarede 2008). Parmi les modèles de croissance crustale, plusieurs s'accordent pour une croissance crustale précoce (**Figure I – 7**) (Taylor 1985). Les âges des zircons indiquent plutôt une croissance crustale épisodique et irrégulière (Martin 2006; Guitreau, Eilts et al. 2012).

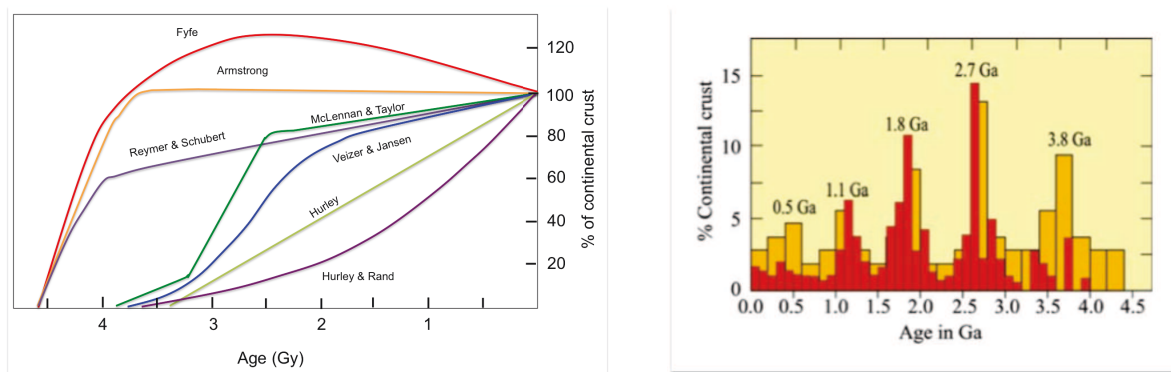


Figure I – 7 : A) Modèles de croissance crustale (reproduit d'après Taylor et McLennan, 1985) ; B) Taux de croissance crustale (orange) et distribution temporelle des âges U-Pb des zircons (rouge) (extrait de Martin et al., 2006)

II.1.2. *Croûte primitive et tectonique des plaques*

Les terrains Archéens sont globalement dominés par des roches mafiques et ultramafiques.

La croûte océanique est caractérisée par des komatiites, roches ultramafiques produites par un fort degré de fusion ($> 50\%$) d'un manteau chaud (Martin 2006; Dilek and Polat 2008), ainsi que des BIF (Banded Iron Formation), ou formations de fer rubanées, formées par sédimentation chimique. La croûte continentale Archéenne est principalement formée de TTG (Tonalites Trondhjemite et Granodiorite), roches riches en silice $> 64\%$, voire $>70\%$, et pauvre en fer et magnésium (<5 poids%) (Martin 1999).

Une tectonique horizontale aurait été initiée très tôt à 3.9 Ga, peu de temps après la fin de l'Hadéen (Kato and Nakamura 2003; Dilek and Polat 2008). Les TTG se forment par fusion d'un basalte hydraté, probablement dans un contexte de **subduction**. Contrairement à la tectonique des plaques modernes où le coin de manteau hydraté est à l'origine des magmas en contexte de subduction, c'est la plaque subductée elle-même qui fond pour donner les TTG (**Figure I – 8**) (Martin 1999). En effet, comme le manteau est plus chaud à l'Archéen, le solidus hydraté est atteint plus rapidement.

On trouve également des structures verticales dans les terrains Archéens, probablement à cause de la différence de densité entre komatiites et BIF de densité forte d'environ 3,3 et les TTG, de densité 2,7 environ. Cette tectonique verticale est appelée **sagduction**.

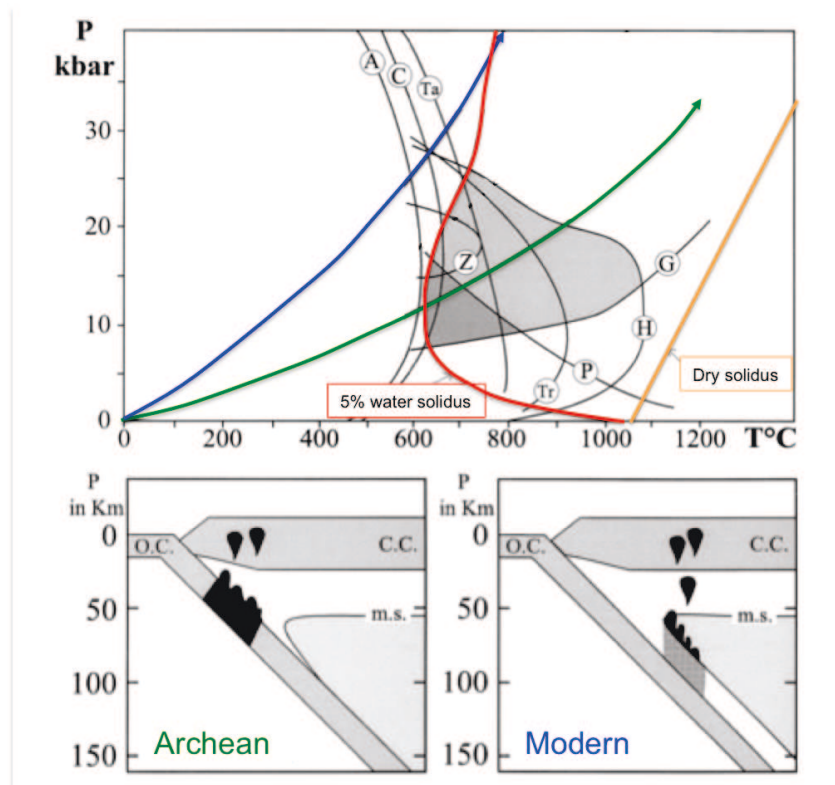


Figure I – 8 : Genèse des magmas dans un contexte de subduction à l'Archéen et à l'actuel (modifié d'après Martin et al., 1999). Trajet P-T vert = Archéen ; trajet P-T bleu : actuel.

Les processus tectoniques influent sur la composition atmosphérique, notamment la pression partielle de CO_2 et donc sur le climat (Lowe and Tice 2004; Lowe and Tice 2007). La subduction est un puits de CO_2 , tandis que le recyclage crustal relâche du CO_2 dans l'atmosphère. La présence de continent et leur érosion entraîne également un flux de nutriments vers les océans, comme le phosphore, abondamment utilisé par la biosphère (Lindsay and Brasier 2002). L'activité géologique a donc pu avoir une large influence sur l'évolution de la pré-biosphère.

II.2. Enveloppes externes fluides

II.2.1. Présence précoce d'une hydrosphère

Les zircons de Jack Hills présentent des valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ élevées, qui indiquent des interactions eau-roche (Peck, Valley et al. 2001; Wilde, Valley et al. 2001). De l'eau liquide

était donc présente sur Terre avant 4,1 Ga, possiblement à 4,4 Ga, ce qui suggère l'existence d'un océan primitif précoce (Mojzsis, Harrison et al. 2001; Wilde, Valley et al. 2001).

II.2.2. Origine des volatils

L'eau et les autres volatils peuvent provenir de 2 sources :

- le dégazage du manteau
- l'apport externe par des météorites et comètes.

Le rapport K/U permet d'évaluer la perte de volatils subie par un corps planétaire, car K est plus volatil que U. Si les chondrites carbonées présentent un rapport K/U d'environ 60000, celui de la Terre n'est que de 10000 (Albarède 2009 et références incluses). La Terre aurait donc perdu 85% de ses volatils après son accrétion. Elle aurait donc logiquement perdu également l'eau. Le dégazage du manteau ne peut donc pas être à l'origine de la totalité des enveloppes externes. La plus grande partie de l'hydrosphère/atmosphère doit donc provenir d'un apport externe par accrétion de météorites, comètes et astéroïdes, appelé vernis tardif (Albarede 2009).

II.2.3. Composition atmosphérique

L'atmosphère terrestre au début de l'histoire de la planète aurait été principalement composée de gaz à effet de serre, le CO₂ et le CH₄, donnant lieu à des températures de surfaces entre 70°C et 80°C (Kasting 1988; Lowe and Tice 2004). Avant 3.2 Ga, le rapport CH₄/CO₂ aurait été très inférieur à 1 (Lowe and Tice 2004). L'abondance du méthane CH₄ dépendrait de l'efficacité de sa production abiotique, par les réactions de serpentinisation des roches ultramafiques (Sleep, Meibom et al. 2004). Les pressions partielles de CO₂ seraient restées très élevées grâce au recyclage tectonique (Lowe&Tice 2004, 2007) permettant de compenser la plus faible luminosité du soleil jeune (**Figure I – 9**) (Kasting 1993). Des valeurs comprises entre 10 et 10⁴ fois la pression partielle actuelle (entre 10⁻³ et 10 bars) sont proposées (Kasting 1993; Morse and Mackenzie 1998; Lowe and Tice 2004; Kasting and Howard 2006).

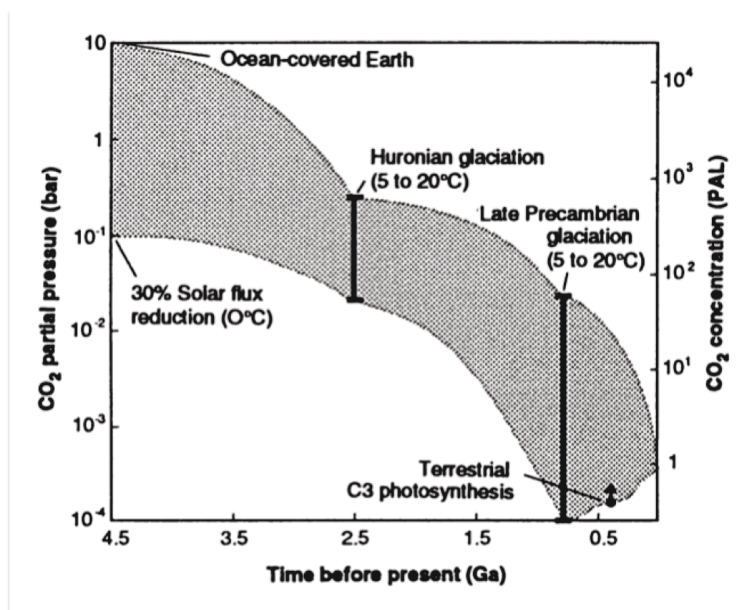


Figure I - 9 : Concentrations atmosphériques en CO₂ nécessaires pour compenser un soleil jeune moins lumineux (extrait de Kasting et al., 1993)

Sleep et Zahnle (2001) proposent des pressions partielles de CO₂ bien plus élevées, entre 40 et 210 bars, soit une température de surface de 230°C à 4,5 Ga. La pression partielle de CO₂ aurait cependant diminué fortement et rapidement grâce à la subduction de croûte océanique (Sleep 2010).

L'atmosphère était très probablement anoxique à l'Hadéen/début de l'Archéen. Les compositions isotopiques en soufre ont montré que l'atmosphère s'est oxygénée massivement à partir de 2,5 Ga suite à l'apparition des cyanobactéries (Bekker, Holland et al. 2004; Kump 2008). Des événements d'oxygénation précoces pourraient aussi avoir eu lieu à 3,2 Ga. Avant la hausse de la concentration en oxygène dans l'atmosphère, et donc avant formation d'une couche d'ozone, la Terre primitive recevait un rayonnement UV plus important (Cockell 1998). Entre la Terre actuelle et la Terre primitive, les quantités d'UVB et UVC reçues augmentent de 3,7 à 11,7 W/m², et de 0 à 3,1 W/m², respectivement. Or, les rayonnements UV dégradent les molécules organiques (Cockell 1998). Les surfaces minérales (Cockell 1998) ainsi que les ions ferriques en solution (Gomez, Aguilera et al. 2007) pourraient avoir protégé les molécules prébiotiques des dégradations liées aux UV. Une origine de la vie dans

un contexte de fonds océaniques, près des sources hydrothermales sous-marines, permettrait d'être protégé des radiations UV (Cleaves and Miller 1998).

II.2.4. L'Océan Hadéen/Archéen : paramètres physico-chimiques

- *Température*

Robert et Chaussidon (2006) ont analysé par microsonde ionique les compositions isotopiques en oxygène et en silicium de cherts datés de 3.5 Ga à 0.5 Ga. Les résultats indiquent une température de surface des océans plus élevée à l'Archéen, atteignant en moyenne 75°C (Figure I - 10).

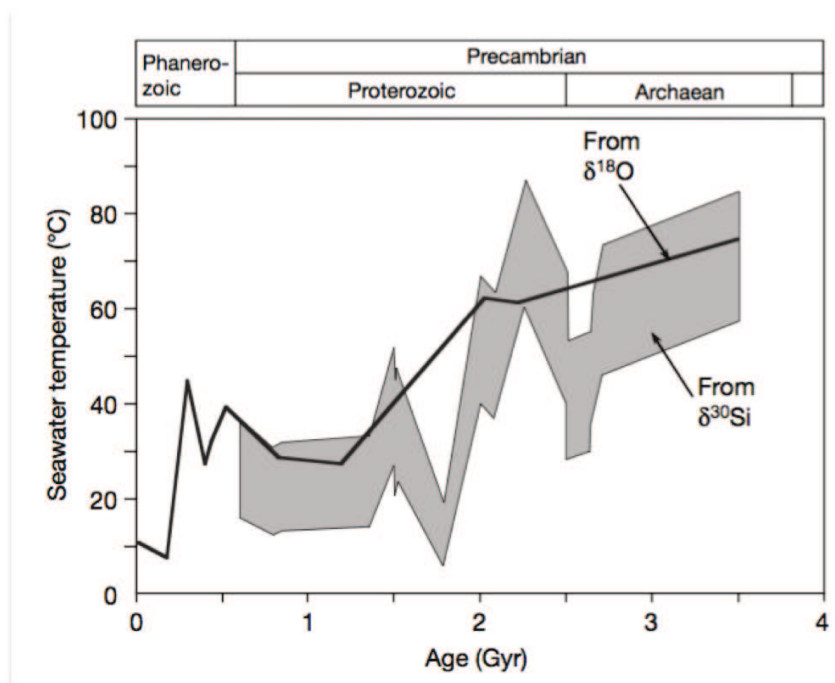


Figure I - 10 : Evolution de la température océanique d'après les données isotopiques en O et Si de Cherts de 3.5 à 0.5 Ga. (extrait de Robert et Chaussidon, 2006)

Ces températures sont cohérentes avec les résultats de Knauth et al. (Knauth and Lowe 2003; Knauth 2005), qui rapportent une température océanique comprise entre 55 et 85°C. Pour Kasting (2006), l'évolution du $\delta^{18}\text{O}$ reflète plutôt l'évolution de la composition de l'océan au cours du temps, et non une évolution de la température. Valley et al. (Valley, Peck et al. 2002;

Valley 2006) argumentent en faveur d'un refroidissement rapide dans les 200-300 premiers Ma.

- *pH*

L'océan primitif est en équilibre avec une atmosphère très riche en CO_2 . Par conséquent, il devait être plus acide que ne l'est l'océan moderne dont le pH est de 8,2 en moyenne (Macleod, Mckeown et al. 1994; Pinti 2005). En tenant compte de la pression partielle de CO_2 de l'atmosphère hadéenne, le pH de l'océan Hadéen aurait été de 5.5 environ (Macleod, Mckeown et al. 1994; Morse and Mackenzie 1998; Pinti 2005) (**Figure I - 11**)

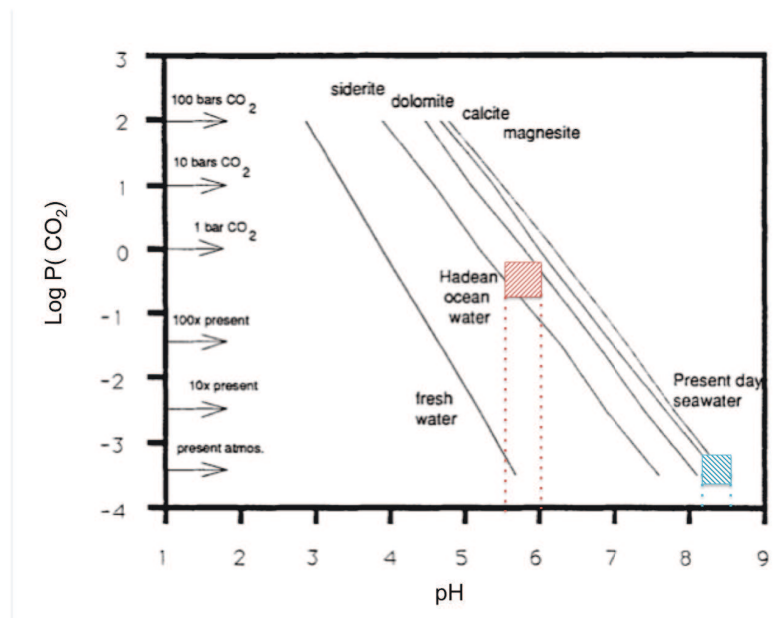


Figure I - 11 : Diagramme $\text{P}(\text{CO}_2)$ – pH plaçant les océans actuel et primitif (modifié d'après MacLeod et al, 1994). La $\text{P}(\text{CO}_2)$ considérée à l'Hadéen est ici d'environ 10^3 fois la pression partielle actuelle.

Un océan Hadéen / Archéen globalement acide est cohérent avec les dépôts de BIFs observés au début du Protérozoïque (Pinti 2005). En effet, les ions ferreux Fe^{2+} sont solubles dans un océan anoxique, réducteur, à des pH compris entre 0 et 6. La précipitation massive de BIF au début du protérozoïque peut donc être expliquée par une accumulation d'ions Fe^{2+} au cours de l'archéen, suivie d'un changement de pH et d'environnement rédox entraînant sa précipitation sous forme ferrique.

- *Salinité*

La salinité de l'océan primitif n'est pas bien contrainte. L'analyse par microthermométrie d'inclusions fluides dans des roches archéennes de 2,2 à 3,75 Ga indique une salinité forte (Weiershauser and Spooner 2005). A l'Hadéen/Archéen, la surface continentale aurait été trop faible pour former des mers fermées propices à une cristallisation de halite par évaporation (Sleep 2010). Knauth (2005) calcule qu'en ajoutant l'intégralité des dépôts de halite et de saumures présentes sur les continents à l'océan moderne, l'océan primitif aurait eu une salinité 1,6 à 2 fois plus élevée que la salinité actuelle (Knauth 2005; Sleep 2010).

II.2.5. *Hydrothermalisme*

Dans cet océan actuel, il existe des champs hydrothermaux non loin des dorsales océaniques (**Figure I - 12**).

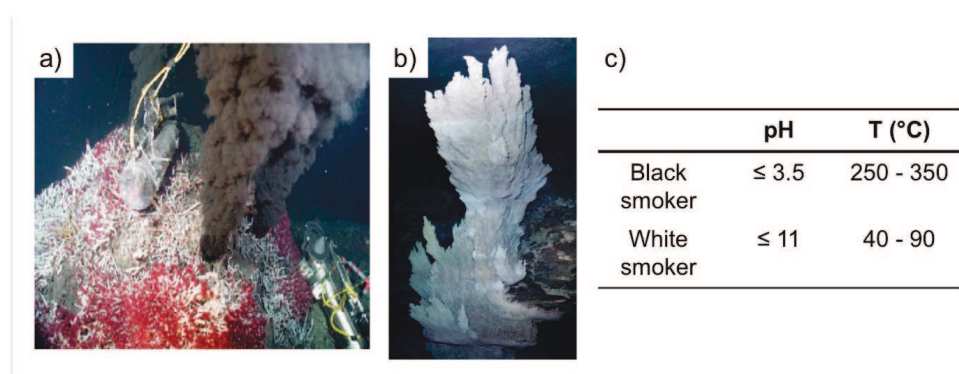


Figure I - 12: Comparaison des 2 types de champs hydrothermaux. a) fumeur noir ; b) fumeur blanc (Lost City, photo : Kelley) ; c) températures et pH des fluides hydrothermaux (d'après Charlou 2002 ; Russell et Hall, 2006 ; Konn et al., 2009 ; Kelley 2005)

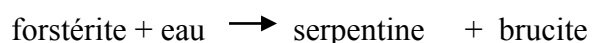
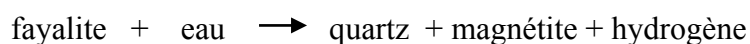
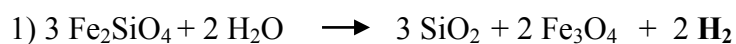
A la dorsale (1-5 km), des cheminées constituées principalement de sulfures, les fumeurs noirs, émettent des fluides hydrothermaux de hautes températures (allant de 250 à 350–400°C) et bas pH ≤ 3 (Macleod, Mckeown et al. 1994; Charlou, Donval et al. 2002). Les conditions extrêmes n'ont pas empêché la colonisation de ces champs hydrothermaux par de nombreuses espèces vivantes, notamment des archées sulfo-réductrices

chimiolithoautotrophes responsables de la formation de matière organique, permettant la présence d'hétérotrophes comme des annélides ou des mollusques.

Plus récemment, un second type d'hydrothermalisme a été découvert à proximité de la dorsale atlantique (15 km), dans le champ hydrothermal de Lost City dominé par les serpentinites (Kelley, Karson et al. 2001). Les cheminées hydrothermales ici composées de carbonates CaCO_3 et de brucite $\text{Mg}(\text{OH})_2$ émettent des fluides hydrothermaux riches en H_2 et CH_4 , de températures moyennes entre 40 et 90°C, et de pH alcalin entre 9 et 11 (Kelley, Karson et al. 2001; Kelley, Karson et al. 2005; Russell 2006; Konn, Charlou et al. 2009). On les appelle les fumeurs blancs. Lost City héberge également un écosystème complexe.

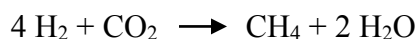
Ce système hydrothermal repose sur les réactions de serpentinitisation. Les serpentines sont des phyllosilicates ferromagnésiens, de formule générale $(\text{Mg,Fe})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, et sont formées actuellement dans 2 contextes : l'altération hydrothermale près des dorsales, comme dans le champ hydrothermal de Lost City, et les volcans de boues de serpentinites au niveau des chenaux de subduction (Mottl, Komor et al. 2003). Dans ce dernier contexte, le pH est élevé entre 9 et 12, et les températures faibles à modérées (20°C au sommet des volcans, et jusqu'à 100-250°C en profondeur) (Mottl, Komor et al. 2003).

A partir d'olivine de formule $(\text{Mg,Fe})_2\text{SiO}_4$, solution solide entre la fayalite (pôle pur ferrique) et la forstérite (pôle pur magnésien), les réactions modèles de serpentinitisation s'écrivent:



La serpentinitisation produit de la magnétite et de la brucite, mais surtout de l'hydrogène moléculaire (Sleep, Meibom et al. 2004; Russell 2006; Schulte, Blake et al. 2006; McCollom

and Bach 2009; Russell, Hall et al. 2010; Sleep, Bird et al. 2011). Le H₂ formé réagit avec le CO₂ dissout pour former du méthane selon la réaction :



Cette réaction est catalysée par la magnétite en conditions hydrothermales (Sleep, Meibom et al. 2004). La serpentinisation aurait été une source d'énergie pour les premières formes de vie (Russell, Hall et al. 2010). Ainsi, la découverte de serpentine sur Mars (Quesnel, Sotin et al. 2009; Ehlmann, Mustard et al. 2011) a apporté un nouvel argument pour la recherche de vie passée sur Mars.

Konn et al. (2009) comparent les fluides hydrothermaux d'un fumeur noir du champ de Rainbow (pH 3.4-3.8 ; température 325-360°C) et d'un fumeur blanc de Lost city (pH 10-11.7 ; température 60-95°C). Si les 2 types de fluides sont enrichis en composés organiques C6-C18, Lost City présente un clair enrichissement en composés organiques aromatiques, ainsi qu'en H₂ et CH₄.

II.3. Habitabilité ?

La **Figure I – 13** dresse le bilan des conditions géologiques et environnementales supposées sur la Terre Hadéenne/Archéenne.

Quelles sont les conditions d'habitabilité d'une planète, permettant l'initiation et le maintien d'une ou des formes de vie ? Premièrement, de l'eau liquide doit être présente (Nisbet and Sleep 2001). Nous avons vu que c'est le cas très tôt dans l'histoire de la Terre, avant 4.1 Ga, possiblement 4.4 Ga. Deuxièmement la planète doit être active, afin de maintenir les flux de chaleur et de composés chimiques nécessaires au développement et au maintien des formes de vies (Nisbet 2003).

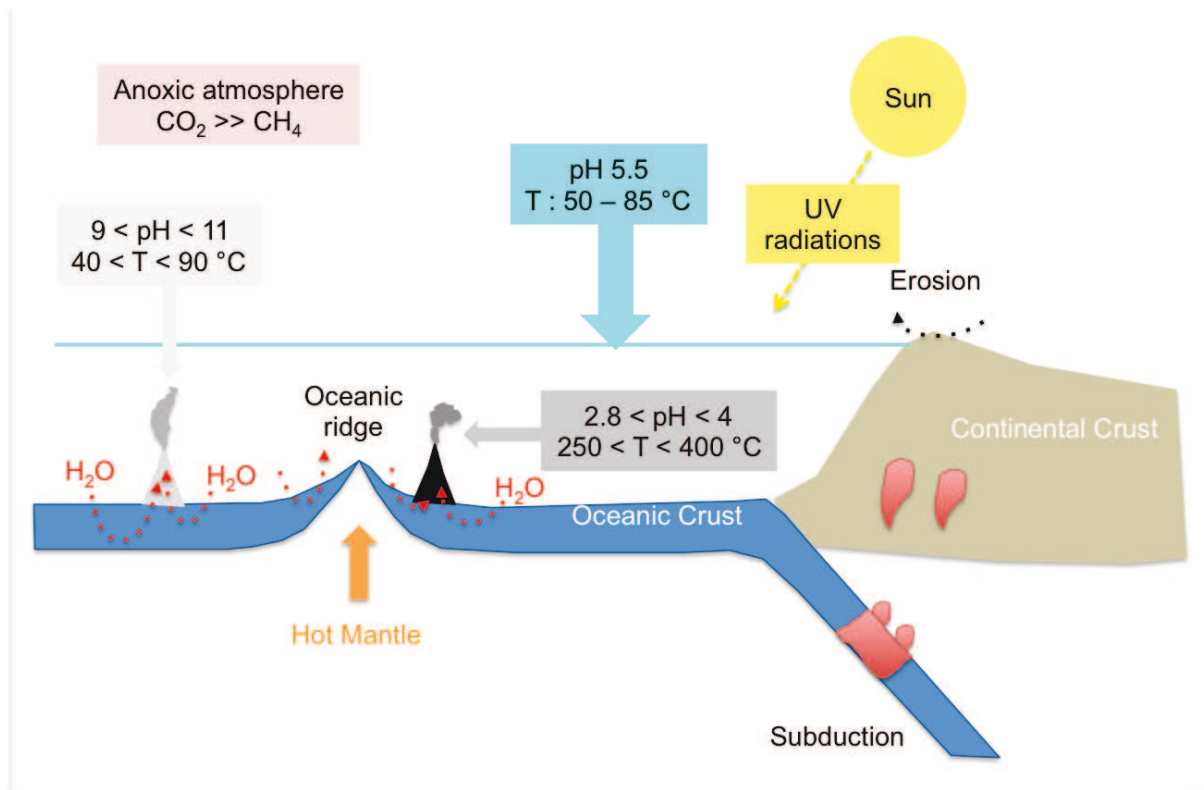


Figure I - 13 : Bilan des conditions géologiques et environnementales à l'Hadéen/Archéen.

Une croûte continentale est présente précocement à la fin de l'Hadéen/début de l'Archéen, et la tectonique des plaques est également initiée au début de l'Archéen. Subduction, hydrothermalisme, érosion continentale et recyclage crustal sont donc actifs. De plus, des gradients thermiques et chimiques (pH, oxido-réduction, composition ionique) sont présents au niveau des fluides hydrothermaux (Hazen and Sverjensky 2010). Les conditions d'habitabilité sont donc réunies sur la Terre Hadéenne/Archéenne, même s'il est probable que les océans aient été vaporisés plusieurs fois par de larges impacts au cours du bombardement tardif, et la surface terrestre éventuellement stérilisée (Nisbet and Sleep 2001; Zahnle, Arndt et al. 2007).

II.4. Minéralogie des fonds océaniques Hadéens / Archéens

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'hypothèse de l'origine de la Vie sur le fond des océans Hadéens/Archéens. Je ne détaillerai ici que la minéralogie des

fonds océaniques de la fin de l'Hadéen/début de l'Archéen, *i.e.* avant le grand épisode d'oxygénation de 2.5 Ga.

La diversité minéralogique présente lors des premiers millions d'années de la Terre est liée à plusieurs phénomènes pétrologiques et géochimiques : volcanisme, dégazage, recyclage, métamorphisme, cristallisation fractionnée, interactions avec l'océan et donc altération aqueuse et hydrothermale... (Hazen, Papineau et al. 2008).

La minéralogie des roches archéennes possiblement présentes dans les fonds marins Hadéens/Archéens et est reportée dans le **Tableau I – 1** (Papineau 2010).

Tableau I - 1 : Minéraux des roches volcano-sédimentaires archéennes. (d'après Papineau 2010)

Type de roche	Protolithe	Minéraux majeurs	Minéraux mineurs
Roches métavolcaniques	Roches ultramafiques, Komatiite, Greenstone, Amphibolite	Olivine, pyroxènes, grenat, biotite, chlorite, amphibole	Serpentine, magnetite, talc, magnesite, épidote, phlogopite, rutile, calcite, apatite, sulfures ...
BIF	Chert riche en fer	Quartz, magnetite, amphibole	Pyroxènes, olivine, grenat, chlorite, hématite, zircon, goethite, graphite...
Schistes (métapélites)	Marnes ± détritiques	Quartz, biotite, amphibole, grenat, chlorite	Mica, rutile, magnétite, sulfures, zircon...
Calc-silicate et roches carbonatées métamorphiques	Chert ? Edifice hydrothermal ? Contact métagénétique ?	Quartz, siderite, dolomite, calcite, magnesite, magnetite	Pyroxènes, olivine, amphibole, grenat, micas, chlorite, sulfures, graphite...

Les terrains archéens sont clairement dominés par des roches mafiques et ultra-mafiques, dont les minéraux majoritaires sont l'olivine et les pyroxènes. L'altération aqueuse ou hydrothermale de ces minéraux induit notamment la formation de serpentines, de chlorite et autres phyllosilicates, ainsi que des oxydes de fer et de titane, des sulfates et des carbonates (Hazen, Papineau et al. 2008). Étant donné la composition chimique des protolithes riches en Fe et Mg, la formation de phyllosilicates ferromagnésiens tels que la nontronite ou la chlorite,

aurait été favorisée par rapport aux phyllosilicates alumineux tels que la montmorillonite (Meunier, Petit et al. 2010), qui sont pourtant les minéraux principalement étudiés dans le cadre de l'origine de la Vie.

III. Des molécules prébiotiques aux premiers polymères génétiques : rôle des surfaces minérales

La formation des premiers polymères génétiques nécessite au moins trois étapes. Premièrement, les briques élémentaires ou nucléotides, doivent se former à partir de molécules prébiotiques. Ensuite, une concentration de ces monomères est nécessaire pour permettre leur organisation en polymère ou polymérisation. L'hypothèse d'une action des surfaces minérales dans l'origine des biopolymères date du début des années 50 (Bernal 1951) poursuivie depuis.

III.1. Synthèse prébiotique des nucléotides

III.1.1. Précurseurs disponibles

De quoi dispose-t-on initialement dans le monde prébiotique?

Une partie de la matière organique prébiotique provient d'un apport extérieur par les météorites et les comètes. Certaines météorites sont en effet particulièrement riches en matière organique, notamment la météorite de Murchison où plusieurs nucléobases ont été détectées (Stoks and Schwartz 1979; Strasdeit 2005). De nombreuses études rapportent également la synthèse abiotique de nucléotides dans des conditions spatiales (Kuzicheva and Simakov 1999). De la matière organique provient également de synthèses consécutives à un apport d'énergie dans l'atmosphère ou l'hydrosphère de la Terre. L'énergie nécessaire à la synthèse de molécules organiques peut provenir de différentes sources : thermique, radiative (UV, gamma), énergie d'impacts, énergie chimique... (Miller and Urey 1959; Pascal 2006). La source d'énergie la plus étudiée est la décharge électrique (Miller and Urey 1959; Bada

and Lazcano 2003; Cleaves, Chalmers et al. 2008; Parker, Cleaves et al. 2011). En particulier, la formation d'acides aminés a été mise en évidence dans une atmosphère réductrice (Cleaves, Chalmers et al. 2008; Parker, Cleaves et al. 2011). Des petites molécules organiques telles que le cyanure d'hydrogène HCN, le formaldéhyde NH_2CHO , le formamide HCONH_2 et l'urée NH_2CONH_2 sont également spontanément obtenues par décharges dans des mélanges gazeux de CH_4 , CO , CO_2 , NH_3 , N_2 et eau. La synthèse prébiotique de nucléotides à partir de ces précurseurs est étudiée depuis les années 50, notamment par les groupes de Oro, Ferris et Orgel (Orgel 2004; Saladino, Crestini et al. 2005).

La synthèse d'un nucléotide peut se faire de deux façons. Soit les composants du nucléotide (sucre, phosphate et base azotée) sont formés séparément et assemblés (voir review par Saladino 2005 ; Orgel 2004), soit les nucléotides sont directement synthétisés à partir de précurseurs prébiotiques (travail de John Sutherland et son groupe).

III.1.2. Synthèse par étape des composants du nucléotide et assemblage

Des voies de synthèses des bases azotées existent sans besoin de catalyse. La disponibilité du ribose est le facteur limitant dans la synthèse de nucléotides par ce chemin. Les sucres, dont le ribose, sont en effet formés par réaction du formaldéhyde dans du $\text{Ca}(\text{OH})_2$ chaud, appelée en anglais « **formose reaction** » (Orgel 2004; Benner, Kim et al. 2010), mais le rendement de la réaction pour le ribose est inférieur à 1 % (Saladino 2005).

Les bases puriques comme l'adénine sont par exemple synthétisées par condensation d'HCN à fortes concentrations (Oro and Kimball 1961; Ferris, Yanagawa et al. 1984; Shapiro 1984), ou par hydrolyse acide de polymères d'HCN (Ferris, Joshi et al. 1978). Ces synthèses nécessitent de fortes concentrations en précurseurs qui ne sont pas assurées à l'Hadéen/Archéen. Des très faibles températures et un gel des océans/étendues d'eau pourrait être compatibles avec ce genre de synthèse, par concentration à l'eutectique (Miyakawa,

Cleaves et al. 2002). Les bases pyrimidiques sont synthétisées avec des rendements globalement encore plus faibles que les bases puriques (Saladino 2005).

En présence d'un catalyseur minéral, les bases puriques et pyrimidiques sont synthétisées par condensation de formamide (Saladino, Crestini et al. 2001). Selon le type de minéral, une sélection des molécules opère et les rendements observés pour les diverses bases diffèrent. Par exemple, les zéolites favorisent la synthèse de cytosine. Au contraire, la montmorillonite induit la production d'une large gamme de nucléobases (Saladino 2005 et références incluses). Les minéraux jouent donc non seulement un rôle de **catalyseur**, mais ils opèrent une **sélection** des molécules synthétisées.

Les nucléosides sont formés par chauffage à sec de purines et de D-ribose (Saladino 2005). L'obtention d'un nucléotide par phosphorylation d'un nucléoside est ensuite possible en présence d'un agent de condensation comme l'HCN. Le phosphate inorganique est la source de phosphate prébiotique la plus plausible (Orgel 2004 et références incluses). Cependant, les rendements de phosphorylation sont faibles, et la réaction n'est pas ou peu régiosélective (Saladino 2005).

Des rendements faibles à chaque étape successive rendent cette voie de synthèse peu favorable.

III.1.3. Synthèse directe des nucléotides

De récentes études ont permis de synthétiser des nucléotides (**Figure I – 14**) directement à partir de molécules prébiotiques probables, cyanamide, cyanoacétylène, glycolaldéhyde, glyceraldéhyde et phosphate inorganique (Powner, Gerland et al. 2009). Cette synthèse apparaît plausible dans le contexte prébiotique.

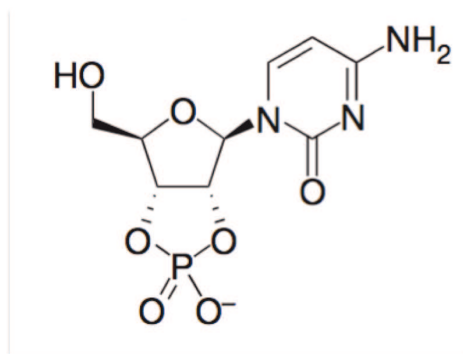


Figure I - 14 : Nucléotide formé par la synthèse de Powner et al. (2009).

Récemment, l'équipe de Sutherland a de plus montré qu'en protégeant un groupe hydroxyle par acétylation, on pouvait obtenir quasi exclusivement des liaisons 3'-5' (école de printemps LIO, juin 2012, Lyon). Cependant, ces réactions nécessitent la présence d'imidazole, dont la présence en abondance à l'Hadéen/Archéen peut être discutable (Orgel 2004 ; Saladino 2005).

III.2. Adsorption de nucléotides par les surfaces minérales

L'océan primitif aurait été peu concentré en molécules organiques (Cohn, Hansson et al. 2001; Hazen and Sverjensky 2010). La probabilité d'une polymérisation est alors faible (Shapiro 1984). Une étape de concentration préalable des briques élémentaires est nécessaire. Deux hypothèses principales ont été proposées. Premièrement, l'interface entre un milieu aqueux et un milieu lipidique, immiscibles, pourrait servir de surface de concentration (Monnard and Deamer 2002). La présence de minéraux favorise de plus la formation spontanée de vésicules lipidiques, apportant ainsi un moyen de formation des premières protocellules à membrane lipidique (Hanczyc, Fujikawa et al. 2003; Chen, Roberts et al. 2004; Hanczyc, Mansy et al. 2007). Deuxièmement, les surfaces minérales ont la capacité d'adsorber les molécules organiques (acides aminés, nucléotides, ...) (Lahav and Chang 1976; Banin, Lawless et al. 1985; Ferris, Ertem et al. 1989; Ferris 1999; Ertem, Prabahar et al. 2000; Hazen 2006; Lambert 2008)), c'est à dire de les retenir et de les concentrer à sa surface. L'ubiquité des surfaces minérales en fait des candidats incontournables en tant qu'agent de concentration.

Le **Tableau I – 2** regroupe une liste non exhaustive des études réalisées sur l'adsorption d'acides nucléiques sur les surfaces minérales, en précisant le(s) minéral(aux) et le type d'acide nucléique considéré(s). L'adsorption des acides nucléiques, nucléotides, et composants des nucléotides sur les surfaces minérales a été amplement étudiée, notamment sur les oxydes de fer (Holm, Ertem et al. 1993; Cai, Huang et al. 2006; Cleaves, Crapster-Pregont et al. 2011) et de titane (Cleaves, Jonsson et al. 2010; Cleaves, Crapster-Pregont et al. 2011), mais principalement sur les phyllosilicates (Banin, Lawless et al. 1985; Ferris and Hagan 1986; Ferris, Ertem et al. 1989; Ferris 1999; Cai, Huang et al. 2006; Mignon, Ugliengo et al. 2009; Hashizume, van der Gaast et al. 2010). La smectite montmorillonite est de loin la surface la plus étudiée.

Tableau I – 2 : Liste non exhaustive d'études d'adsorption des acides nucléiques sur les surfaces minérales.

Etude	Acide nucléique	Minéral considéré
Banin et al., 1985	ADN	Montmorillonite
Lorentz et Wackernagel, 1987	ADN	Sable (quartz)
Ferris et al., 1988	Nucléotides et oligonucléotides, ARN	Montmorillonite
Romanovski et al., 1991 et 1992	ADN	Extraits de sols
Holm et al., 1993	Adénine, nucléotides, oligonucléotides (ARN)	Oxydes de fer : goethite et akaganéite
Bezanilla et al., 1995	ADN	Mica, calcite, fluorite, barite
Trevors et al., 1996	ADN	Extraits de sols
Franchi et al., 1999	ADN et ARN	Montmorillonite, kaolinite
Demanèche et al., 2001	ADN	Kaolinite, illite, montmorillonite
Ogram et al., 2002	ADN	Diverses agiles, quartz
Franchi et al., 2003	ADN	Montmorillonite, kaolinite
Scappini et al., 2004	ADN	Montmorillonite, kaolinite
Aisawa et al., 2005	Nucléotides ARN	LDH
Cai et al., 2006	ADN	Kaolinite, montmorillonite, goethite
Pietramellara et al., 2007	ADN	Montmorillonite, kaolinite
Cai et al., 2008	ADN	Montmorillonite
Hatton et Rickard, 2008	ADN, ARN, nucléotides, -sides et A	FeS
Benetoli et al., 2008	Bases azotées	Bentonite, kaolinite, montmorillonite

Etude	Acide nucléique	Minéral considéré
Mignon et al., 2009	Bases azotées	Montmorillonite
Swalding et al., 2010	ARN	Montmorillonite
Hashizume et al., 2010	Bases azotées, ribose, phosphate	Montmorillonite
Cleaves et al., 2010	Bases azotées, nucléosides, nucléotides (ARN et ADN)	Rutile
Cleaves et al., 2011	Oligonucléotides ADN	Olivine, pyrite, rutile, hématite, calcite

Les acides nucléiques s'adsorbent en quantité importante sur les surfaces minérales (*e.g.* Cleaves et al., 2010). Ils sont alors protégés des dégradations, qu'elles soient liées à l'action d'une enzyme (Lorenz and Wackernagel 1987), ou aux radiations UV (Cockell 1998; Scappini 2004). De plus, l'adsorption par complexe de coordination des molécules organiques sur les minéraux améliore leur stabilité thermique (Hazen 2006), ce qui pourraient contribuer à les préserver notamment en conditions hydrothermales (Kawamura, Nagahama et al. 2005). Les surfaces minérales jouent donc aussi un rôle de **protection** des molécules organiques.

Il est donc important de comprendre le mécanisme d'adsorption, car il contrôle les quantités de molécules adsorbées, et peut de plus imposer des configurations spatiales peu propices à une polymérisation par la suite (Hazen 2006).

Le type d'acide nucléique influe sur la quantité adsorbée. Sur des surfaces de FeS, l'ADN chromosomique double-brin s'adsorbe en plus grande quantité que l'ARN, qui lui même s'adsorbe en plus grande quantité que l'ADN simple-brin, les nucléotides, nucléosides, et bases azotées (Hatton and Rickard 2008). Une adsorption différentielle est également observée entre les bases azotées, ainsi qu'entre les nucléotides, à la fois en surface de la montmorillonite (Hashizume, van der Gaast et al. 2010), et du rutile (Cleaves, Jonsson et al.

2010). Deux hypothèses sont proposées pour expliquer cette différence. Pour Hashizume et al. (2010) les différences d'adsorption reflètent des solubilités variées ; pour Cleaves et al. (2010), les bases interagissent avec la surface minérale. Des simulations numériques ont été réalisées concernant l'adsorption de bases azotées sur la montmorillonite (Mignon, Ugliengo et al. 2009). Les bases G et C s'adsorberaient d'avantage que A, U et T, et toutes pourraient s'adsorber en configuration orthogonale ou en configuration parallèle (**Figure I – 15 a**). Hashizume et al. (2010) rapportent une très forte adsorption du phosphate. Les interactions avec la surface minérale se font donc plutôt par le groupe phosphate, même si une interaction par les bases n'est pas exclue. D'après les simulations de Swadling et al. (2010), à pH 7 l'ARN s'adsorbe au niveau des bases parallèlement à la surface de montmorillonite, et les cations libres en surface jouent le rôle de médiateur entre la base azotée neutre et la surface globalement chargée négativement (**Figure I - 15 b**).

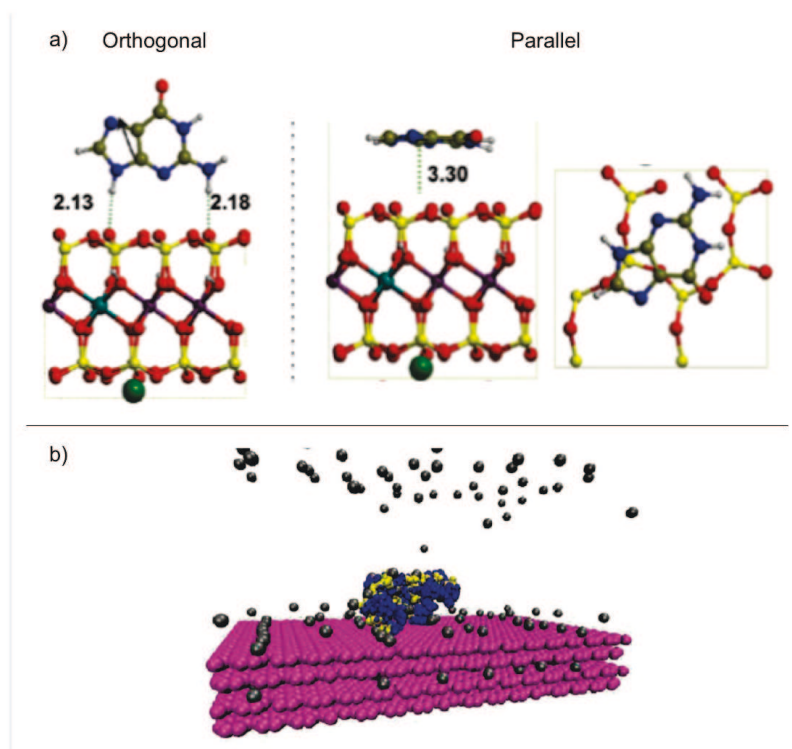


Figure I - 15 : a) interaction des bases azotées avec la surface de montmorillonite (d'après Mignon et al., 2009). b) interaction d'un brin d'ARN avec la surface de la montmorillonite via l'interaction 'base azotée-cation-surface' (Swadling, Coveney et al. 2010)

Franchi et al. (2003) proposent également une interaction avec les cations libres en surface : un pont serait formé par les cations entre le squelette phosphaté chargé négativement de l'ARN et la surface de montmorillonite (**Figure I – 16 a**). On observe en effet une adsorption plus élevée en présence de cations divalents qu'en présence de cations monovalents sur la montmorillonite (**Figure I – 16 b**) et à concentrations en cations élevées (Franchi, Ferris et al. 2003; Cai, Huang et al. 2006).

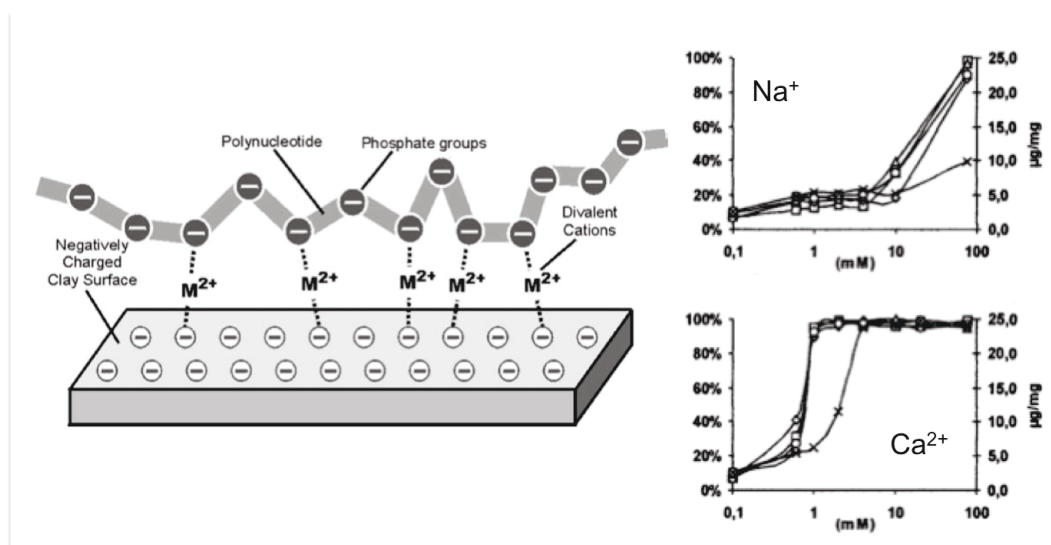


Figure I - 16: a) Adsorption de séquences d'ARN par un « pont » de cations ; b) Quantités d'ADN adsorbées sur la montmorillonite en fonction de la concentration en cation (Na^+ ou Ca^{2+}) (d'après Franchi et al., 2003).

Enfin, l'évolution de l'adsorption en fonction du pH a été étudiée sur la montmorillonite (Banin, Lawless et al. 1985), ainsi que sur le rutile (Cleaves, Jonsson et al. 2010). La quantité adsorbée dépend du pH et augmente à faible pH, ce qui suggère un mécanisme d'adsorption électrostatique.

III.3. Polymérisation catalysée par les surfaces minérales

La polymérisation des nucléotides en oligonucléotides se produit sans catalyseur en présence de molécules de polyC servant de guide à la réaction et d'un agent de condensation (Sulston, Lohrmann et al. 1969). En présence d'imidazole par exemple, des mononucléotides se

condensent en quadrimères (4-mer) (Ibanez, Kimball et al. 1971). L'imidazole est également utilisé en tant que groupement activateur sur le groupe phosphate de nucléotides activés ; cela donne lieu à la formation d'oligonucléotide de 20 bases (Inoue and Orgel 1982). Mais à nouveau, la présence d'imidazole en abondance dans le milieu prébiotique est loin d'être avérée (Orgel 2004; Saladino, Crestini et al. 2005). Des groupes activateurs plus plausibles comme l'adénine méthylée ont également été testés (Huang and Ferris 2006) (**Figure I – 17**).

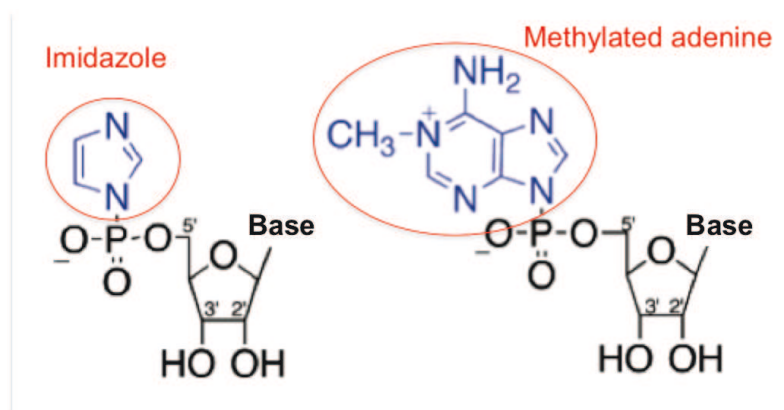


Figure I – 17 : Nucléotides activés utilisés pour les réactions d'oligomérisations d'ARN (en présence de montmorillonite ou non) (modifié d'après Huang 2006)

Ferris et son groupe du RPI (Rensselaer Polytechnic Institute) ont montré que la réaction d'oligomérisation de l'ARN est catalysée par la présence de montmorillonite, et n'ont cessé de travailler à mieux comprendre cette réaction de catalyse, et d'améliorer les rendements et les longueurs des polymères obtenus (voir review par (Ferris 2005)). Le **Tableau I - 3** liste les études concernant la polymérisation d'ARN catalysée par les surfaces minérales, c'est à dire sur la montmorillonite, la seule étudiée de fait.

Des polymères de 50 bases sont obtenus en 1 jour en présence de montmorillonite, sans avoir recours à une amorce oligonucléotidique pour initier la réaction (Huang and Ferris 2006). La réaction de polymérisation est régiosélective, et induit une homochiralité (Ertem and Ferris 2000; Miyakawa and Ferris 2003; Joshi, Aldersley et al. 2011).

Toutes les montmorillonites ne sont apparemment pas catalytiques (Joshi, Aldersley et al. 2009) ; de plus, une préparation préalable de l'argile est nécessaire (procédure Banin, détaillée dans Joshi et al., 2009). Les montmorillonites sont protonées et rendues homoioniques. Malgré le succès en terme de polymérisation, le mécanisme reste mal compris.

Tableau I - 3 : Liste non exhaustive d'études réalisées sur la polymérisation des acides nucléiques catalysée par les surfaces minérales.

Etude	Information apportée	Etude	Information apportée
Ferris et Ertem, 1992	Tests Montmorillonites, nontronite, allophane, imogolite et sepiolite	Ferris et al., 2003	6 – 14 mer 40-mer (si addition quotidienne)
Ferris et Ertem 1993	11-mer	Huang et Ferris, 2003	35-40 mer. (1 jour)
Ertem et al., 1997	olygoC + montm → oligoG 2'-5' et 3'-5'	Miyakawa et al., 2006	Effet des sels, de la T° et du pH
Ertem et Ferris, 1998	Site de catalyse	Huang et al., 2006	40-50 – mer (1 jour)
Kawamura et Ferris, 1999	heptamers	Joshi et al., 2007	Sélectivité des (D, L) nucléotides
Ertem et al., 2000	Séquence- et régio-sélectivité	Joshi et al., 2009	Mécanisme de polymérisation 22 montm.
Urata et al., 2000	10-mer	Mathew et al., 2010	Simulations numériques
Wang et al., 2001	Effet d'inhibiteurs sur la réaction	Joshi et al., 2011	Homochiralité
Ferris et al., 2002	30 – 50 mer (14 jours, addition quotidienne)	Aldersley et al., 2011	Mécanisme de polymérisation
Miyakawa et Ferris, 2003	Séquence- et régio-sélectivité		

Ertem et Ferris (1998) ont étudié des montmorillonites modifiées i) sur les faces latérales ou ii) dans l'espace interfoliaire afin d'identifier les sites de catalyse. Ils ont montré que la quantité d'oligomères produits décroît fortement si l'espace interfoliaire est bloqué, ce qui suggère que l'espace interfoliaire est principalement responsable de la polymérisation. Les

simulations numériques de Mathew (2010) vont dans ce sens et indiquent que les réactions menant aux liaisons phosphodiester 3'-5' des polymères génétiques actuellement dans les organismes vivants auraient lieu dans l'espace interfoliaire principalement. Aldersley et al. (2011) proposent aussi un mécanisme de catalyse acido-basique dans l'espace interfoliaire (**Figure I - 18**).

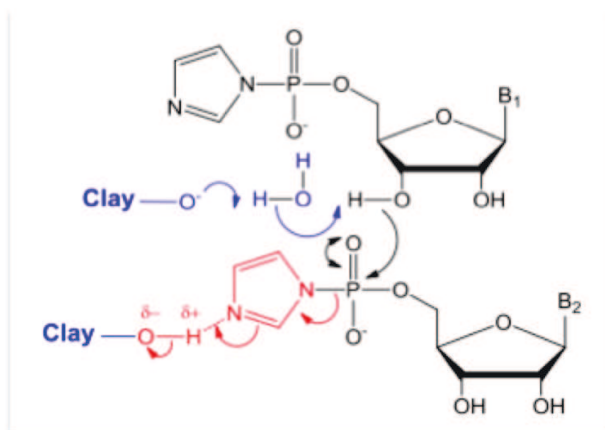


Figure I – 18 : Mécanisme proposé par Aldersley et al. (2011) pour la formation des liaisons phosphodiester par catalyse acido-basique au sein de l'espace interfoliaire de la montmorillonite.

Les minéraux ont donc un rôle multiple dans l'origine du matériel génétique. Ils catalysent la formation des nucléotides tout en opérant une sélection moléculaire, ils concentrent et protègent les acides nucléiques des dégradations, et catalysent la polymérisation.

L'adsorption et la polymérisation des acides nucléiques ont surtout été étudiées sur les phyllosilicates, très majoritairement sur les montmorillonites. Les phyllosilicates sont des minéraux chargés qui présentent des larges surfaces disponibles pour l'adsorption et/ou la polymérisation (Hazen 2006). Cependant, si l'on réexamine la **Minéralogie des fonds océaniques Hadéens/Archéens (paragraphe II.4.)**, la montmorillonite n'est pas abondante dans le contexte de l'origine de la vie. D'autres phyllosilicates plus riches en fer et en magnésium, comme la chlorite, la nontronite et les serpentines sont largement plus abondants (Hazen, Papineau et al. 2008; Meunier, Petit et al. 2010). Nous allons donc nous examiner le

potentiel d'adsorption de ces phyllosilicates ferro-magnésiens par rapport à celui des montmorillonites.

III.4. Les phyllosilicates ferromagnésiens, produits d'altération de la croûte océanique hadéenne

III.4.1. Structure

Les phyllosilicates sont organisés en feuillets composés d'empilements de couches de tétraèdres de silice notées T et d'octaèdres d'Alumine notées O. Chaque couche est formée de plans d'atomes d'oxygènes coordonnés autour de cations, Si^{4+} pour les tétraèdres et Al^{3+} ou Mg^{2+} pour les octaèdres. On distingue plusieurs structures selon l'enchaînement des couches T et O (**Figure I - 19**). Les phyllosilicates de structure 1 : 1 sont composés de feuillets à une couche T et une couche O. Il existe également des phyllosilicates de structure 2 : 1 où 2 couches T encadrent 1 couche O, et des phyllosilicates de types 2 : 1 : 1 où une couche O s'insère entre 2 feuillets TOT. Quelques phyllosilicates représentatifs de ces structures sont présentés en **Figure I - 19**.

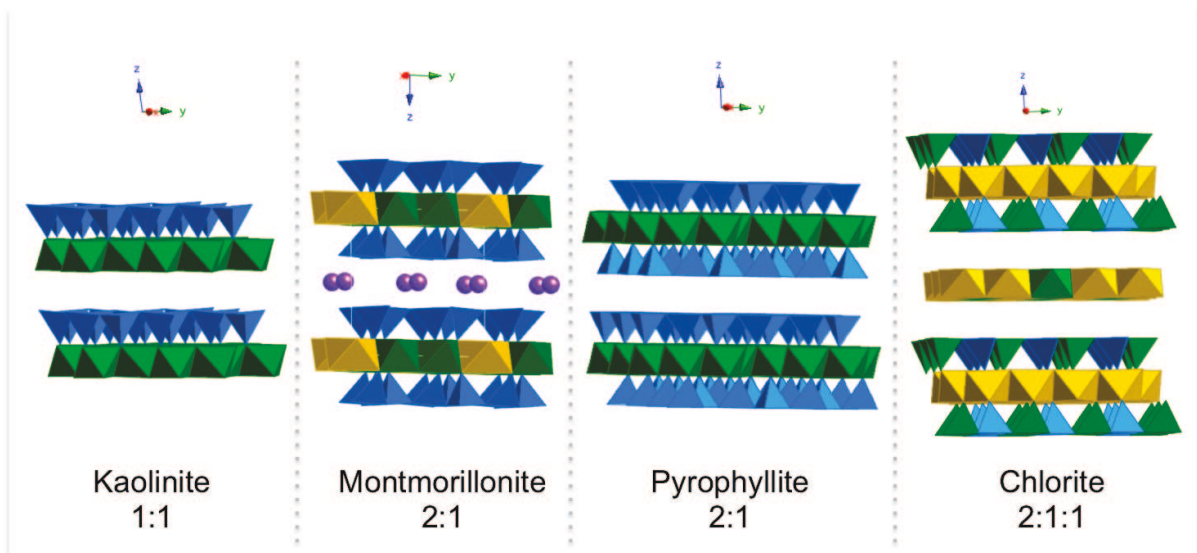


Figure I - 19 : Exemples de phyllosilicates représentatifs des différentes structures possibles. Bleu = tétraèdres de silice ; vert = octaèdres d'alumine ; jaune = octaèdres de magnésium ; violet = cations intercalaires. (bibliothèque du logiciel Crystal Maker)

Les phyllosilicates sont parfois classés selon la valence des cations présents dans la couche octaédriques. Si 2/3 des cations sont trivalents, le minéral est dioctaédrique. Si la totalité des cations sont divalents, le minéral est trioctaédrique.

La structure en feuillet des phyllosilicates leur confère des surfaces spécifiques importantes. Dans le contexte de l'origine de la vie, cela en fait des surfaces potentiellement cruciales à la fois pour la concentration des briques élémentaires des biomolécules, mais également pour la catalyse de la polymérisation de ces biopolymères.

Au sein des phyllosilicates, la structure 2 : 1, composée d'une couche O encadrée par 2 couches T, concerne à la fois des argiles dites gonflantes telles que les smectites, et des argiles non gonflantes. Les smectites, comme la montmorillonite ou la nontronite, subissent des substitutions isomorphes dans les couches O et T. Des cations de valence inférieure remplacent les cations structuraux Al^{3+} et Si^{4+} . Par exemple, Al^{3+} remplace Si^{4+} dans certains sites tétraédriques, et Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} remplacent Al^{3+} dans certains sites octaédriques. Les cations Mg^{2+} peuvent également être substitués par des cations monovalents tels que Li^{+} . Ces substitutions par des cations de valence moindre entraînent un déficit de charge pour les feuillets ; cette charge est alors compensée par la présence de cations dans l'espace interfoliaire (**Figure I – 19**). Les smectites ont la capacité d'échanger des cations avec leur environnement. De plus, les smectites ont la propriété de « gonfler » selon les conditions d'hydratation et la force ionique. Leur surface spécifique est alors considérablement augmentée.

III.4.2. Les serpentines

Plusieurs types de serpentine existent avec lizardite, chrysotile, et antigorite parmi les plus communs. Tous présentent des feuillets de type 1 : 1, mais l'organisation de ces feuillets est différente pour chaque polymorphe. Si la lizardite possède des feuillets simplement empilés (**Figure I - 20 a**), l'antigorite présente des modulations de longueur d'onde variable (**Figure I**

- **20 c)**, et le chrysotile est caractérisé par des feuillets recourbés sur eux-mêmes, formant ainsi des nanotubes (**Figure I - 20 b**).

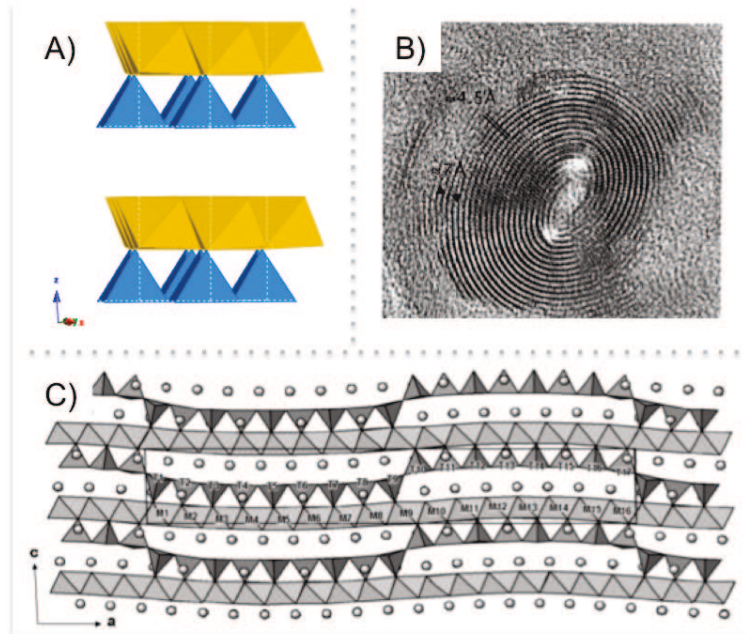


Figure I - 20 : Structures des différentes variétés de serpentines. A) Structure d'une lizardite (bibliothèque Crystal Maker) ; B) Chrysotile : Image MET d'une section de fibre de chrysotile (Devouard and Baronnet 1995) ; C) Structure de l'antigorite (Capitani and Mellini 2004)

Comme nous nous intéressons au contexte de fonds océaniques, nous considérons uniquement la lizardite et le chrysotile qui sont des polymorphes de basse pression susceptibles d'y être présents. Le chrysotile se formerait à partir de lizardite à haute température (**Figure I - 21**) (Evans 2004).

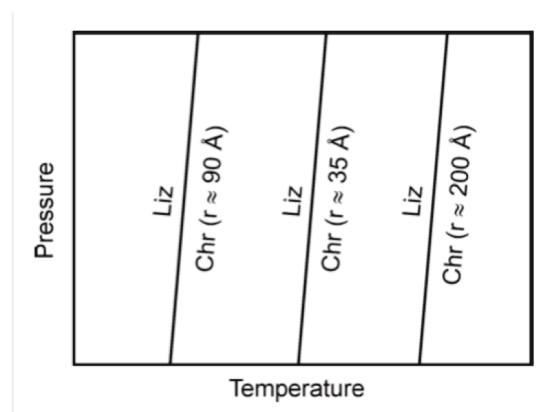


Figure I - 21 : Relations Pression-Température possible entre lizardite et fibres de chrysotile de rayon variable (Evans 2004).

III.4.3. Sites d'adsorption et mécanismes proposés

L'adsorption sur les surfaces des phyllosilicates se fait selon 2 procédés :

- par physisorption via des interactions faibles avec des molécules d'eau, des ions ou des groupes hydroxyles (Hazen and Sverjensky 2010). Ces liaisons sont appelées liaisons de coordination ('outer-sphere' adsorption en anglais).
- par chemisorption, où des liaisons chimiques se forment entre l'adsorbat et la surface. On parle également de complexe de coordination ('inner-sphere complex' en anglais). Les molécules adsorbées adoptent une configuration à 1 ou plusieurs points d'attache ((Sverjensky, Jonsson et al. 2008; Jonsson, Jonsson et al. 2009)

Sur les surfaces de phyllosilicates, plusieurs sites d'adsorption sont possibles (Thomas, Michot et al. 1999; Zarzycki and Thomas 2006; Rozalen, Brady et al. 2009). Les faces latérales des particules de phyllosilicates portent des groupements amphotériques Si – OH et Al – OH (**Figure I - 22**), qui sont communs à tous les phyllosilicates. Le plan basal est en revanche différent entre les smectites et les autres phyllosilicates. Chez les smectites, le plan basal est occupé par des cations intercalaires, qui contrebalancent la charge structurale du feuillet (**Figure I - 22**). Ces sites sont sujets à l'échange ionique si l'adsorbat est chargé positivement.

Pour les smectites, on peut donc aussi envisager une intercalation des nucléotides dans l'espace interfoliaire, par exemple par échange ionique avec les cations interfoliaires. C'est le cas lors de l'adsorption de nucléotides sur des particules de LDH (layered double-hydroxides), minéraux en feuillets chargés positivement et possédant des anions intercalaires (Aisawa, Ohnuma et al. 2005). Aldersley et al. (Aldersley, Joshi et al. 2011) rapportent une intercalation de nucléotides activés dans l'espace interfoliaire de montmorillonites. D'autres études contredisent cependant ce résultat (Franchi, Bramanti et al. 1999; Franchi and Gallori 2004).

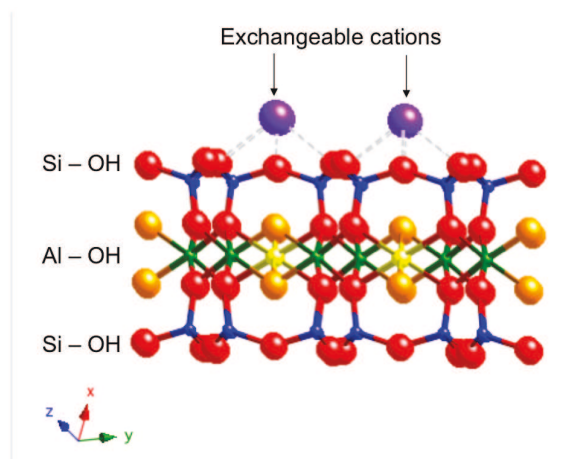


Figure I – 22 : Sites d'adsorption disponibles pour un feuillet de montmorillonite pour illustrer le cas général des smectites (Zarzycki 2006, Thomas 1999, Rozalen 2009)

Nous avons étudié l'adsorption des nucléotides sur divers phyllosilicates ferromagnésiens, de structure et de propriétés de surface variées, plausibles dans l'environnement de Hadéen et/ou Archéen. Dans un 2nd chapitre, nous présentons les nucléotides et minéraux choisis, ainsi que les protocoles expérimentaux. Les données obtenues sont regroupées dans le chapitre 3. L'interprétation des données en terme de mécanisme d'adsorption des nucléotides à la surface des phyllosilicates ferro-magnésiens fait l'objet du 4^{ème} chapitre. Enfin, le cinquième chapitre conclue sur les conditions environnementales optimales pour une adsorption maximale des nucléotides sur les surfaces minérales, et propose quelques pistes pour approfondir le sujet.

Références bibliographique

- Aisawa, S., Y. Ohnuma, et al. (2005). "Intercalation of nucleotides into layered double hydroxides by ion-exchange reaction." *Applied Clay Science* **28**(1-4): 137-145.
- Albarede, F. (2009). "Volatile accretion history of the terrestrial planets and dynamic implications." *Nature* **461**(7268): 1227-1233.
- Aldersley, M. F., P. C. Joshi, et al. (2011). "The role of montmorillonite in its catalysis of RNA synthesis." *Applied Clay Science* **54**(1): 1-14.
- Allwood, A. and M. Anderson (2009). "3.45 Billion Year Old Stromatolite Reef of Western Australia: A Rich, Large-Scale Record of Early Biota, Strategies and Habitats." *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **39**(3-4): 188-189.
- Altman, S., M. F. Baer, et al. (1989). "Catalysis by the Rna Subunit of Rnase-P - a Minireview." *Gene* **82**(1): 63-64.
- Anet, F. A. (2004). "The place of metabolism in the origin of life." *Current Opinion in Chemical Biology* **8**(6): 654-659.
- Bada, J. L. and A. Lazcano (2003). "Prebiotic soup - Revisiting the Miller experiment." *Science* **300**(5620): 745-746.
- Banin, A., J. G. Lawless, et al. (1985). "Ph Profile of the Adsorption of Nucleotides onto Montmorillonite .2. Adsorption and Desorption of 5'-Amp in Iron-Calcium Montmorillonite Systems." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **15**(2): 89-101.
- Bekker, A., H. D. Holland, et al. (2004). "Dating the rise of atmospheric oxygen." *Nature* **427**(6970): 117-120.
- Benner, S. A., H. J. Kim, et al. (2010). "Planetary Organic Chemistry and the Origins of Biomolecules." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(7).
- Bernal, J. D. (1951). *The physical basis of life*.
- Blichert-Toft, J. and F. Albarede (2008). "Hafnium isotopes in Jack Hills zircons and the formation of the Hadean crust." *Earth and Planetary Science Letters* **265**(3-4): 686-702.
- Bohler, C., P. E. Nielsen, et al. (1995). "Template Switching between Pna and Rna Oligonucleotides." *Nature* **376**(6541): 578-581.
- Borg, L. E., J. N. Connelly, et al. (1999). "The age of the carbonates in martian meteorite ALH84001." *Science* **286**(5437): 90-94.
- Bowring, S. A., Williams, I.S. (1999). "Priscoan (4.00-4.03 Ga) orthogneisses from northwestern Canada." *Contrib. Mineral. Petrol.* **134**: 3-16.
- Brasier, M., O. Green, et al. (2004). "Earth's oldest (similar to 3.5 Ga) fossils and the 'Early Eden hypothesis': Questioning the evidence." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **34**(1-2): 257-269.
- Brasier, M. D., O. R. Green, et al. (2002). "Questioning the evidence for Earth's oldest fossils." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **66**(15A): A101-A101.
- Brasier, M. D., O. R. Green, et al. (2002). "Questioning the evidence for Earth's oldest fossils." *Nature* **416**(6876): 76-81.
- Brocks, J. J., G. D. Love, et al. (2005). "Biomarker evidence for green and purple sulphur bacteria in a stratified Palaeoproterozoic sea." *Nature* **437**(7060): 866-870.
- Cai, P., Q. Huang, et al. (2006). "Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol." *Soil Biology & Biochemistry* **38**(3): 471-476.
- Capitani, G. and M. Mellini (2004). "The modulated crystal structure of antigorite: The m=17 polysome." *American Mineralogist* **89**(1): 147-158.
- Cech, T. R. (1988). "Conserved Sequences and Structures of Group-I Introns - Building an Active-Site for Rna Catalysis - a Review." *Gene* **73**(2): 259-271.

- Charlou, J. L., J. P. Donval, et al. (2002). "Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36 degrees 14 ' N, MAR)." Chemical Geology **191**(4): 345-359.
- Chen, I. A., R. W. Roberts, et al. (2004). "The emergence of competition between model protocells." Science **305**(5689): 1474-1476.
- Cleaves, H. J., J. H. Chalmers, et al. (2008). "A reassessment of prebiotic organic synthesis in neutral planetary atmospheres." Origins of Life and Evolution of Biospheres **38**(2): 105-115.
- Cleaves, H. J., E. Crapster-Pregont, et al. (2011). "The adsorption of short single-stranded DNA oligomers to mineral surfaces." Chemosphere **83**(11): 1560-1567.
- Cleaves, H. J., C. M. Jonsson, et al. (2010). "Adsorption of Nucleic Acid Components on Rutile (TiO₂) Surfaces." Astrobiology **10**(3): 311-323.
- Cleaves, H. J. and S. L. Miller (1998). "Oceanic protection of prebiotic organic compounds from UV radiation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(13): 7260-7263.
- Cockell, C. S. (1998). "Biological effects of high ultraviolet radiation on early Earth - a theoretical evaluation." Journal of Theoretical Biology **193**(4): 717-729.
- Cohn, C. A., T. K. Hansson, et al. (2001). "Fate of prebiotic adenine." Astrobiology **1**(4): 477-480.
- Dauphas, N., M. van Zuilen, et al. (2004). "Clues from Fe isotope variations on the origin of early Archean BIFs from Greenland." Science **306**(5704): 2077-2080.
- Devouard, B. and A. Baronnet (1995). "Axial Diffraction of Curved Lattices - Geometrical and Numerical Modeling - Application to Chrysotile." European Journal of Mineralogy **7**(4): 835-846.
- Dilek, Y. and A. Polat (2008). "Suprasubduction zone ophiolites and Archean tectonics." Geology **36**(5): 431-432.
- Ehlmann, B. L., J. F. Mustard, et al. (2011). "Subsurface water and clay mineral formation during the early history of Mars." Nature **479**(7371): 53-60.
- Ehrenfreund, P. and S. B. Charnley (2000). "Organic molecules in the interstellar medium, comets, and meteorites: A voyage from dark clouds to the early earth." Annual Review of Astronomy and Astrophysics **38**: 427-+.
- Ertem, G. and J. P. Ferris (1998). "Formation of RNA oligomers on montmorillonite: site of catalysis." Orig Life Evol Biosph **28**(4-6): 485-499.
- Ertem, G. and J. P. Ferris (2000). "Sequence- and regio-selectivity in the montmorillonite-catalyzed synthesis of RNA." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **30**(5): 411-422.
- Ertem, G., K. J. Prabakar, et al. (2000). "Bridging the prebiotic and RNA worlds: Prebiotic RNA synthesis on clay." Journal of Biomolecular Structure & Dynamics: 207-210.
- Evans, B. W. (2004). "The serpentinite multisystem revisited: Chrysotile is metastable." International Geology Review **46**(6): 479-506.
- Ferris, J. P. (1999). "Prebiotic synthesis on minerals: Bridging the prebiotic and RNA worlds." Biological Bulletin **196**(3): 311-314.
- Ferris, J. P. (2005). "Mineral catalysis and prebiotic synthesis: Montmorillonite-catalyzed formation of RNA." Elements **1**(3): 145-149.
- Ferris, J. P., G. Ertem, et al. (1989). "The Adsorption of Nucleotides and Polynucleotides on Montmorillonite Clay." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **19**(2): 153-164.
- Ferris, J. P. and W. J. Hagan (1986). "The Adsorption and Reaction of Adenine-Nucleotides on Montmorillonite." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **17**(1): 69-84.

- Ferris, J. P., P. C. Joshi, et al. (1978). "HCN: a plausible source of purines, pyrimidines and amino acids on the primitive earth." Journal of Molecular Evolution **11**(4): 293-311.
- Ferris, J. P., H. Yanagawa, et al. (1984). "The Prebiotic Chemistry of Nucleotides." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **14**(1-4): 99-106.
- Forterre, P. (2005). "The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells." Biochimie **87**(9-10): 793-803.
- Franchi, M., E. Bramanti, et al. (1999). "Clay-nucleic acid complexes: Characteristics and Implications for the preservation of genetic material in primeval habitats." Origins of Life and Evolution of Biospheres **29**(3): 297-315.
- Franchi, M., J. P. Ferris, et al. (2003). "Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **33**(1): 1-16.
- Franchi, M. and E. Gallori (2004). "Origin, persistence and biological activity of genetic material in prebiotic habitats." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **34**(1-2): 133-141.
- Gilbert, W. (1986). "Origin of Life - the Rna World." Nature **319**(6055): 618-618.
- Gomez, F., A. Aguilera, et al. (2007). "Soluble ferric iron as an effective protective agent against UV radiation: Implications for early life." Icarus **191**(1): 352-359.
- Guitreau, A. M., B. E. Eilts, et al. (2012). "Fish Handling and Ultrasound Procedures for Viewing the Ovary of Submersed, Nonanesthetized, Unrestrained Channel Catfish." North American Journal of Aquaculture **74**(2): 182-187.
- Hanczyc, M. M., S. M. Fujikawa, et al. (2003). "Experimental models of primitive cellular compartments: Encapsulation, growth, and division." Science **302**(5645): 618-622.
- Hanczyc, M. M., S. S. Mansy, et al. (2007). "Mineral surface directed membrane assembly." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **37**(1): 67-82.
- Harrison, T. M., J. Blichert-Toft, et al. (2005). "Heterogeneous Hadean hafnium: evidence of continental crust at 4.4 to 4.5 ga." Science **310**(5756): 1947-1950.
- Hashizume, H., S. van der Gaast, et al. (2010). "Adsorption of adenine, cytosine, uracil, ribose, and phosphate by Mg-exchanged montmorillonite." Clay Minerals **45**(4): 469-475.
- Hatton, B. and D. Rickard (2008). "Nucleic acids bind to nanoparticulate iron (II) monosulphide in aqueous solutions." Origins of Life and Evolution of Biospheres **38**(3): 257-270.
- Hazen, R. M. (2006). "Mineral surfaces and the prebiotic selection and organization of biomolecules." American Mineralogist **91**(11-12): 1715-1729.
- Hazen, R. M., D. Papineau, et al. (2008). "Mineral evolution." American Mineralogist **93**(11-12): 1693-1720.
- Hazen, R. M. and D. A. Sverjensky (2010). "Mineral Surfaces, Geochemical Complexities, and the Origins of Life." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **2**(5).
- Holm, N. G., G. Ertem, et al. (1993). "The Binding and Reactions of Nucleotides and Polynucleotides on Iron-Oxide Hydroxide Polymorphs." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **23**(3): 195-215.
- Hoover, R. B. (2008). "Microfossils of Filamentous Prokaryotes in CI1 and CM2 Meteorites." Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology XI **7097**.
- Huang, W. H. and J. P. Ferris (2006). "One-step, regioselective synthesis of up to 50-mers of RNA oligomers by montmorillonite catalysis." Journal of the American Chemical Society **128**(27): 8914-8919.
- Ibanez, J. D., A. P. Kimball, et al. (1971). "Condensation of mononucleotides by imidazole." Journal of Molecular Evolution **1**(1): 112-114.

- Inoue, T. and L. E. Orgel (1982). "Oligomerization of (guanosine 5'-phosphor)-2-methylimidazolidine on poly(C). An RNA polymerase model." Journal of Molecular Biology **162**(1): 201-217.
- Javaux, E. J., C. P. Marshall, et al. (2010). "Organic-walled microfossils in 3.2-billion-year-old shallow-marine siliciclastic deposits." Nature **463**(7283): 934-U108.
- Jonsson, C. M., C. L. Jonsson, et al. (2009). "Attachment of L-Glutamate to Rutile (alpha-TiO₂): A Potentiometric, Adsorption, and Surface Complexation Study." Langmuir **25**(20): 12127-12135.
- Joshi, P. C., M. F. Aldersley, et al. (2009). "Mechanism of Montmorillonite Catalysis in the Formation of RNA Oligomers." Journal of the American Chemical Society **131**(37): 13369-13374.
- Joshi, P. C., M. F. Aldersley, et al. (2011). "Homochiral Selectivity in RNA Synthesis: Montmorillonite-catalyzed Quaternary Reactions of D, L-Purine with D, L-Pyrimidine Nucleotides." Origins of Life and Evolution of Biospheres **41**(3): 213-236.
- Kasting, J. F. (1988). "Runaway and moist greenhouse atmospheres and the evolution of Earth and Venus." Icarus **74**: 472-494.
- Kasting, J. F. (1993). "Earth's early atmosphere." Science **259**(5097): 920-926.
- Kasting, J. F. and M. T. Howard (2006). "Atmospheric composition and climate on the early Earth." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1474): 1733-1741; discussion 1741-1732.
- Kato, Y. and K. Nakamura (2003). "Origin and global tectonic significance of Early Archean cherts from the Marble Bar greenstone belt, Pilbara Craton, Western Australia." Precambrian Research **125**(3-4): 191-243.
- Kawamura, K., M. Nagahama, et al. (2005). "Chemical evolution of RNA under hydrothermal conditions and the role of thermal copolymers of amino acids for the prebiotic degradation and formation of RNA." Space Life Sciences: Closed Ecological Systems: Earth and Space Applications **35**(9): 1626-1633.
- Kelley, D. S., J. A. Karson, et al. (2001). "An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30 degrees N." Nature **412**(6843): 145-149.
- Kelley, D. S., J. A. Karson, et al. (2005). "A serpentinite-hosted ecosystem: the Lost City hydrothermal field." Science **307**(5714): 1428-1434.
- Knauth, L. P. (2005). "Temperature and salinity history of the Precambrian ocean: implications for the course of microbial evolution." Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology **219**(1-2): 53-69.
- Knauth, L. P. and D. R. Lowe (2003). "High Archean climatic temperature inferred from oxygen isotope geochemistry of cherts in the 3.5 Ga Swaziland Supergroup, South Africa." Geological Society of America Bulletin **115**(5): 566-580.
- Konn, C., J. L. Charlou, et al. (2009). "Hydrocarbons and oxidized organic compounds in hydrothermal fluids from Rainbow and Lost City ultramafic-hosted vents." Chemical Geology **258**(3-4): 299-314.
- Kump, L. R. (2008). "The rise of atmospheric oxygen." Nature **451**(7176): 277-278.
- Kuzicheva, E. A. and M. B. Simakov (1999). "Abiogenic synthesis of nucleotides in conditions of space flight of the Biosputnik "BION-11"." Life Sciences: Exobiology **23**(2): 387-391.
- Lahav, N. and S. Chang (1976). "The possible role of solid surface area in condensation reactions during chemical evolution: reevaluation." Journal of Molecular Evolution **8**(4): 357-380.
- Lambert, J. F. (2008). "Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review." Origins of Life and Evolution of Biospheres **38**(3): 211-242.

- Lemelle, L., P. Labrot, et al. (2008). "In situ imaging of organic sulfur in 700-800 My-old Neoproterozoic microfossils using X-ray spectromicroscopy at the SK-edge." Organic Geochemistry **39**(2): 188-202.
- Lepot, K., K. Benzerara, et al. (2008). "Microbially influenced formation of 2,724-million-year-old stromatolites." Nature Geoscience **1**(2): 118-121.
- Leu, K., B. Obermayer, et al. (2011). "The prebiotic evolutionary advantage of transferring genetic information from RNA to DNA." Nucleic Acids Research **39**(18): 8135-8147.
- Lindsay, J. F. and M. D. Brasier (2002). "Did global tectonics drive early biosphere evolution? Carbon isotope record from 2.6 to 1.9 Ga carbonates of Western Australian basins." Precambrian Research **114**(1-2): 1-34.
- Lorenz, M. G. and W. Wackernagel (1987). "Adsorption of DNA to Sand and Variable Degradation Rates of Adsorbed DNA." Applied and Environmental Microbiology **53**(12): 2948-2952.
- Lowe, D. R. and M. M. Tice (2004). "Geologic evidence for Archean atmospheric and climatic evolution: Fluctuating levels of CO₂, CH₄, and O₂, with an overriding tectonic control." Geology **32**(6): 493-496.
- Lowe, D. R. and M. M. Tice (2007). "Tectonic controls on atmospheric, climatic, and biological evolution 3.5-2.4 Ga." Precambrian Research **158**(3-4): 177-197.
- Ma, W. and C. Yu (2006). "Intramolecular RNA replicase: possibly the first self-replicating molecule in the RNA world." Orig Life Evol Biosph **36**(4): 413-420.
- Macleod, G., C. Mckeown, et al. (1994). "Hydrothermal and Oceanic Ph Conditions of Possible Relevance to the Origin of Life." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **24**(1): 19-41.
- Martin, H. (1999). "Adakitic magmas: modern analogues of Archean granitoids." Lithos **46**(3): 411-429.
- Martin, H., Claey, P., Gargaud, M., Pinti, D., Selsis, F. (2006). "Environmental context." Earth, Moon, and Planets **98**: 205-245.
- Mathew, D. C. and Z. Luthey-Schulten (2010). "Influence of Montmorillonite on Nucleotide Oligomerization Reactions: A Molecular Dynamics Study." Origins of Life and Evolution of Biospheres **40**(3): 303-317.
- McCollom, T. M. and W. Bach (2009). "Thermodynamic constraints on hydrogen generation during serpentinization of ultramafic rocks." Geochimica Et Cosmochimica Acta **73**(3): 856-875.
- McKay, D. S., E. K. Gibson, et al. (1996). "Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001." Science **273**(5277): 924-930.
- Meunier, A., S. Petit, et al. (2010). "The Fe-Rich Clay Microsystems in Basalt-Komatiite Lavas: Importance of Fe-Smectites for Pre-Biotic Molecule Catalysis During the Hadean Eon." Origins of Life and Evolution of Biospheres **40**(3): 253-272.
- Mignon, P., P. Ugliengo, et al. (2009). "Theoretical Study of the Adsorption of RNA/DNA Bases on the External Surfaces of Na⁺-Montmorillonite." Journal of Physical Chemistry C **113**(31): 13741-13749.
- Miller, S. L. and H. C. Urey (1959). "Organic Compound Synthesis on the Primitive Earth." Science **130**(3370): 245-251.
- Miyakawa, S., H. J. Cleaves, et al. (2002). "The cold origin of life: B. Implications based on pyrimidines and purines produced from frozen ammonium cyanide solutions." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **32**(3): 209-218.
- Miyakawa, S. and J. P. Ferris (2003). "Sequence- and regioselectivity in the montmorillonite-catalyzed synthesis of RNA." Journal of the American Chemical Society **125**(27): 8202-8208.

- Mojzsis, S. J., G. Arrhenius, et al. (1996). "Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago." Nature **384**(6604): 55-59.
- Mojzsis, S. J., T. M. Harrison, et al. (2001). "Oxygen-isotope evidence from ancient zircons for liquid water at the Earth's surface 4,300 Myr ago." Nature **409**(6817): 178-181.
- Monnard, P. A. and D. W. Deamer (2002). "Membrane self-assembly processes: Steps toward the first cellular life." Anatomical Record **268**(3): 196-207.
- Morse, J. W. and F. T. Mackenzie (1998). "Hadean ocean carbonate geochemistry." Aquatic Geochemistry **4**(3-4): 301-319.
- Mottl, M. J., S. C. Komor, et al. (2003). "Deep-slab fuel extremophilic Archaea on a Mariana forearc serpentinite mud volcano: Ocean Drilling Program Leg 195." Geochemistry Geophysics Geosystems **4**.
- Nelson, K. E., M. Levy, et al. (2000). "Peptide nucleic acids rather than RNA may have been the first genetic molecule." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(8): 3868-3871.
- Nielsen, P. E. (1993). "Peptide Nucleic-Acid (Pna) - a Model Structure for the Primordial Genetic Material." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **23**(5-6): 323-327.
- Nisbet, E. G., Fowler, C.M.R (2003). "the early history of life." Treatise on Geochemistry.
- Nisbet, E. G. and N. H. Sleep (2001). "The habitat and nature of early life." Nature **409**(6823): 1083-1091.
- Ohmoto, H., Y. Watanabe, et al. (2006). "Sulphur isotope evidence for an oxic Archaean atmosphere." Nature **442**(7105): 908-911.
- Orgel, L. E. (2004). "Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **39**(2): 99-123.
- Oro, J. and A. P. Kimball (1961). "Synthesis of Purines under Possible Primitive Earth Conditions .1. Adenine from Hydrogen Cyanide." Archives of Biochemistry and Biophysics **94**(2): 217-&.
- Papineau, D. (2010). "Mineral Environments on the Earliest Earth." Elements **6**(1): 25-30.
- Parker, E. T., H. J. Cleaves, et al. (2011). "Enhanced Synthesis of Alkyl Amino Acids in Miller's 1958 H₂S Experiment." Origins of Life and Evolution of Biospheres **41**(6): 569-574.
- Pascal, R., Boiteau, L., Forterre, P., Gargaud, M., Lazcano, A., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., Maurel, M-C., Pereto, J., Prieur, D., Risse, J. (2006). "Prebiotic Chemistry – Biochemistry – Emergence of Life (4.4–2 Ga)." Earth, Moon and Planets **98**: 153-203.
- Patterson, C. (1956). "Age of Meteorites and the Earth." Geochimica Et Cosmochimica Acta **10**(4): 230-237.
- Peck, W. H., J. W. Valley, et al. (2001). "Oxygen isotope ratios and rare earth elements in 3.3 to 4.4 Ga zircons: Ion microprobe evidence for high delta O-18 continental crust and oceans in the Early Archean." Geochimica Et Cosmochimica Acta **65**(22): 4215-4229.
- Pinti, D. L. (2005). "The origin and evolution of the oceans." Lectures in Astrobiology, Vol 1: 83-112.
- Powner, M. W., B. Gerland, et al. (2009). "Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions." Nature **459**(7244): 239-242.
- Quesnel, Y., C. Sotin, et al. (2009). "Serpentinization of the martian crust during Noachian." Earth and Planetary Science Letters **277**(1-2): 184-193.
- Rasmussen, B. (2000). "Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit." Nature **405**(6787): 676-679.
- Robert, F. and M. Chaussidon (2006). "A palaeotemperature curve for the Precambrian oceans based on silicon isotopes in cherts." Nature **443**(7114): 969-972.
- Rosing, M. T. (1999). "C-13-depleted carbon microparticles in > 3700-Ma sea-floor sedimentary rocks from west Greenland." Science **283**(5402): 674-676.

- Rozalen, M., P. V. Brady, et al. (2009). "Surface chemistry of K-montmorillonite: Ionic strength, temperature dependence and dissolution kinetics." Journal of Colloid and Interface Science **333**(2): 474-484.
- Russell, M. J. and A. J. Hall (1997). "The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front." Journal of the Geological Society **154**: 377-402.
- Russell, M. J., A. J. Hall, et al. (2010). "Serpentinization as a source of energy at the origin of life." Geobiology **8**(5): 355-371.
- Russell, M. J., Hall, A.J. (2006). The onset and early evolution of life.
- Saladino, R., C. Crestini, et al. (2005). "On the prebiotic synthesis of nucleobases, nucleotides, oligonucleotides, Pre-RNA and Pre-DNA molecules." Prebiotic Chemistry: From Simple Amphiphiles to Protocell Models **259**: 29-68.
- Saladino, R., C. Crestini, et al. (2001). "A possible prebiotic synthesis of purine, adenine, cytosine, and 4(3H)-pyrimidinone from formamide: implications for the origin of life." Bioorg Med Chem **9**(5): 1249-1253.
- Scappini, F., Casadei, F., Zamboni, R., Franchi, M., Gallori, E., Monti, S. (2004). "Protective effect of clay minerals on adsorbed nucleic acid against UV radiation: possible role in the origin of life." International Journal of Astrobiology **3**(1): 17-19.
- Schidlowski, M. (2001). "Carbon isotopes as biogeochemical recorders of life over 3.8 Ga of Earth history: evolution of a concept." Precambrian Research **106**(1-2): 117-134.
- Schopf, J. W. and A. B. Kudryavtsev (2005). "Three-dimensional Raman imagery of precambrian microscopic organisms." Geobiology **3**(1): 1-12.
- Schopf, J. W., A. B. Kudryavtsev, et al. (2007). "Evidence of archaean life: Stromatolites and microfossils." Precambrian Research **158**(3-4): 141-155.
- Schulte, M., D. Blake, et al. (2006). "Serpentinization and its implications for life on the early Earth and Mars." Astrobiology **6**(2): 364-376.
- Shapiro, R. (1984). "The Improbability of Prebiotic Nucleic-Acid Synthesis." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **14**(1-4): 565-570.
- Shapiro, R. (2000). "A Replicator Was Not Involved in the Origin of Life." IUBMB Life **49**(173-176).
- Sleep, N. H. (2010). "The Hadean-Archaean Environment." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **2**(6).
- Sleep, N. H., D. K. Bird, et al. (2011). "Serpentinite and the dawn of life." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **366**(1580): 2857-2869.
- Sleep, N. H., A. Meibom, et al. (2004). "H₂-rich fluids from serpentinization: geochemical and biotic implications." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 12818-12823.
- Sleep, N. H. and K. Zahnle (2001). "Carbon dioxide cycling and implications for climate on ancient Earth." Journal of Geophysical Research-Planets **106**(E1): 1373-1399.
- Stoks, P. G. and A. W. Schwartz (1979). "Uracil in Carbonaceous Meteorites." Nature **282**(5740): 709-710.
- Strasdeit, H. (2005). "New studies on the Murchison meteorite shed light on the pre-RNA world." Chembiochem **6**(5): 801-+.
- Sulston, J., R. Lohrmann, et al. (1969). "Non-Enzymic Oligonucleotide Synthesis on a Polycytidylate Template." Journal of Molecular Biology **40**(2): 227-&.
- Sverjensky, D. A., C. M. Jonsson, et al. (2008). "Glutamate surface speciation on amorphous titanium dioxide and hydrous ferric oxide." Environmental Science & Technology **42**(16): 6034-6039.
- Swadling, J. B., P. V. Coveney, et al. (2010). "Clay minerals mediate folding and regioselective interactions of RNA: a large-scale atomistic simulation study." Journal of the American Chemical Society **132**(39): 13750-13764.

- Taylor, S. R., McLennan, S.M. (1985). The continental crust: Its composition and evolution.
- Thomas, F., L. J. Michot, et al. (1999). "Layer charge and electrophoretic mobility of smectites." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **159**(2-3): 351-358.
- Treiman, A. H. (2003). "Submicron magnetite grains and carbon compounds in martian meteorite ALH84001: Inorganic, abiotic formation by shock and thermal metamorphism." Astrobiology **3**(2): 369-392.
- Treiman, A. H., H. E. F. Amundsen, et al. (2002). "Hydrothermal origin for carbonate globules in Martian meteorite ALH84001: a terrestrial analogue from Spitsbergen (Norway)." Earth and Planetary Science Letters **204**(3-4): 323-332.
- Valley, J. W. (2006). "Early Earth." Elements **2**(4): 201-204.
- Valley, J. W., W. H. Peck, et al. (2002). "A cool early Earth." Geology **30**(4): 351-354.
- van Zuilen, M. A., A. Lepland, et al. (2003). "Graphite and carbonates in the 3.8 Ga old Isua Supracrustal Belt, southern West Greenland." Precambrian Research **126**(3-4): 331-348.
- van Zuilen, M. A., K. Mathew, et al. (2005). "Nitrogen and argon isotopic signatures in graphite from the 3.8-Ga-old Isua Supracrustal Belt, Southern West Greenland." Geochimica Et Cosmochimica Acta **69**(5): 1241-1252.
- Vannier, J., I. Calandra, et al. (2010). "Priapulid worms: Pioneer horizontal burrowers at the Precambrian-Cambrian boundary." Geology **38**(8): 711-714.
- Weiershauser, L. and E. T. C. Spooner (2005). "Seafloor hydrothermal fluids, Ben Nevis area, Abitibi Greenstone Belt: Implications for Archean (similar to 2.7 Ga) seawater properties." Precambrian Research **138**(1-2): 89-123.
- Wilde, S. A., J. W. Valley, et al. (2001). "Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4 Gyr ago." Nature **409**(6817): 175-178.
- Zahnle, K., N. Arndt, et al. (2007). "Emergence of a habitable planet." Space Science Reviews **129**(1-3): 35-78.
- Zarzycki, P. and F. Thomas (2006). "Theoretical study of the acid-base properties of the montmorillonite/electrolyte interface: Influence of the surface heterogeneity and ionic strength on the potentiometric titration curves." Journal of Colloid and Interface Science **302**(2): 547-559.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Mononucléotides monophosphatés

Les expériences de polymérisation réalisées par l'équipe de Ferris ont été réalisées jusqu'à présent avec des mononucléotides activés par des groupements adénine méthylée ou imidazole. Cependant, la pertinence environnementale de certaines molécules comme l'imidazole reste discutable à l'Hadéen/Archéen (Orgel 2004), dans la mesure où la synthèse des mononucléotides activés est complexe (Prabahar and Ferris 1997). Nous avons choisi de travailler plus simplement avec des mononucléotides non-activés monophosphatés en position 5'. Nous avons systématiquement étudié les ribonucléotides de l'ARN, *i.e.* Adénosine, Cytidine, Guanosine et Uridine. En comparaison et afin d'examiner le rôle du sucre dans l'adsorption des nucléotides, nous avons étudié un 2-désoxyribonucléotide de l'ADN, la Guanosine. Tous ont été achetés chez Sigma-Aldrich, sous la forme de sels de sodium. Ils seront appelé ci après AMP, CMP, GMP, UMP et dGMP, respectivement. Leurs structures 2D et 3D sont représentées en **Figure II – 1**.

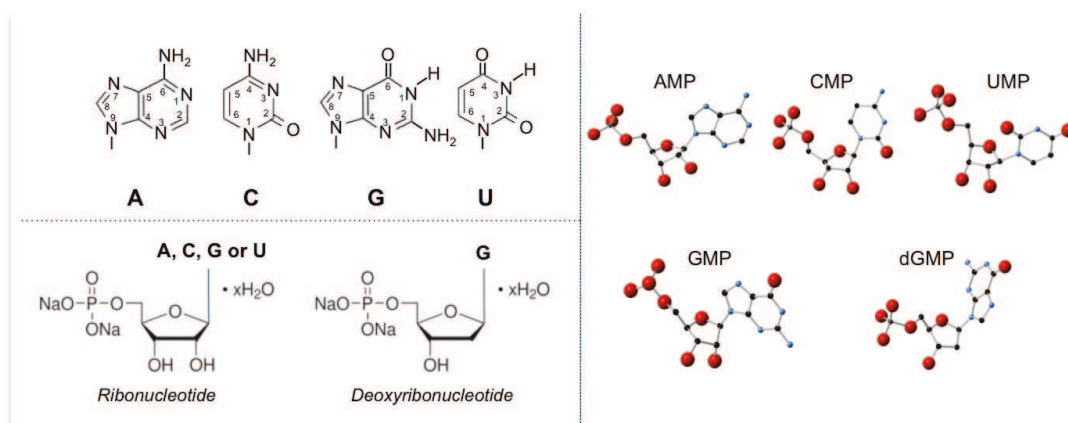


Figure II – 1 : Structure 2- et 3-D des nucléotides étudiés. Les structures 3D ont été réalisées avec le logiciel Crystal Maker.

Leurs masses molaires, solubilités et pKa sont listées dans le **Tableau II – 1**. Si les solubilités des bases azotées sont bien connues (Dworkin and Keller 1977; Dawson 1986; Breslow and Cheng 2009), il n’y a pas d’étude systématique des solubilités expérimentales des nucléotides. Nous utilisons donc des valeurs de solubilité théoriques, calculées avec le programme ALOGPS développé par Tetko et al. (Tetko 2005; Tetko, Gasteiger et al. 2005) (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>).

Tableau II - 1: Caractéristiques des nucléotides étudiés. Le groupe phosphate se protone une seconde fois <pH 1 pour tous les nucléotides.

Abr.	Nom	N° Sigma	Masse molaire (g/mol)	Solubilité ^a		pKa	
				g/l	Mol/l	Site	pKa
AMP	Adénosine	01930	347,2	3.3	$9,5 \times 10^{-3}$	N1	3.8 ^{b,c}
CMP	Cytidine	C1006	323,2	16.3	5×10^{-2}	N3	4.4 ^b
GMP	Guanosine	G8377	363,2	3.6	$9,8 \times 10^{-3}$	N7	2.4 ^{b,c}
						N1	9.5 ^b
						HPO ₄ ⁻	6.3 ^{b,c}
UMP	Uridine	U6375	324,2	12	$3,7 \times 10^{-2}$	N3	9.6 ^b
dGMP	Désoxyguanosine	D9500	347,2	2.7	$7,8 \times 10^{-3}$	N7	2.9 ^c
						N1	> 9 ^b
						HPO ₄ ⁻	6.4 ^c

a : (Tetko 2005) ; b: (Martin 1985); c: (Danyluk 1968)

I.2. Phyllosilicates étudiés

Nous avons focalisé notre étude sur des phyllosilicates ferro-magnésiens potentiellement présents dans le contexte géologique de l’origine de la Vie de structures et de propriétés de surface variées.

Les noms, structures, formules structurales, et provenances des minéraux étudiés sont listés dans le **Tableau II - 2**.

Tableau II - 2: Caractéristiques des phyllosilicates étudiés. (* = acheté à la Clay mineral society ; ** = achetées à la Clay mineral society et traitées au LEM). Les formules structurales de Pyr. et Chrys. sont des formules théoriques.

Nom	Abr.	Provenance	Feuillet	Formule structurale
Montmorillonite	SAz1	Arizona **	TOT	$(\text{Si}_{7.74}\text{Al}_{0.26})(\text{Al}_{3.06}\text{Fe}^{3+}_{0.42}\text{Fe}^{2+}_{0.03}\text{Mg}_{0.48})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{0.77}^{\text{a}}$
Montmorillonite	SWy2	Wyoming **	TOT	$(\text{Si}_{7.95}\text{Al}_{0.05})(\text{Al}_{2.75}\text{Fe}^{3+}_{0.17}\text{Mg}_{1.07})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{1.11}^{\text{a}}$
Nontronite	NAu1	Australie **	TOT	$(\text{Si}_{6.98}\text{Al}_{0.95}\text{Fe}_{0.07})(\text{Al}_{0.36}\text{Fe}_{3.61}\text{Mg}_{0.04})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{1.05}^{\text{b}}$
Nontronite	NAu2	Australie **	TOT	$(\text{Si}_{7.55}\text{Al}_{0.16}\text{Fe}_{0.29})(\text{Al}_{0.34}\text{Fe}_{3.54}\text{Mg}_{0.05})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{0.72}^{\text{c}}$
Pyrophyllite	Pyr.	LPMCN (Lyon)	TOT	$\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
Chlorite	Chlor.	Californie *	TOT-O	$(\text{Si}_{4.51}\text{Al}_{13.49})(\text{Ca}_{0.05})(\text{Mg}_{4.44}\text{Al}_{6.60}\text{Fe}^{3+}_{3.47}\text{Fe}^{2+}_{3.02}\text{Mn}_{0.01}\text{Ti}_{0.06})\text{O}_{20}(\text{OH})_{16}^{\text{d}}$
Lizardite	Liz.	Ile d'Elbe	TO	$\text{Mg}_{2.74}\text{Fe}_{0.16}\text{Al}_{0.09}\text{Si}_{1.93}\text{Al}_{0.07}\text{O}_5(\text{OH})_4^{\text{e}}$
Chrysotile	Chrys.	Canada (Thetford mines)	TO	$(\text{Mg, Fe})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$

a : (Paineau, Bihannic et al. 2011)

b : (Gates, Slade et al. 2002)

c : (Michot, Baravian et al. 2009)

d : Clay Mineral Society

e : (Mellini and Viti 1994)

Quatre phyllosilicates non-gonflants ont été étudiés.

Une pyrophyllite et une chlorite nous ont été fournies par Sylvie Le Floch, du Laboratoire de Physique des matières condensées et nanostructures (université Lyon1) et par la Clay mineral society, respectivement. Ces 2 échantillons de roche bruts ont été broyés au marteau puis au mortier ; les poudres obtenues ont été triées en taille par filtration. Nous utilisons la fraction de taille $< 50 \mu\text{m}$.

Un chrysotile provient des mines de Thetford (Canada). Initialement sous forme d'échantillon brut, il a été broyé au marteau, puis les fibres ont été séparées au scalpel. La taille des fibres n'a pas pu être précisément mesurée.

Une lizardite provient de l'île d'Elbe. Il est difficile de trouver des serpentinites riches en lizardite pour pouvoir étudier ce minéral à l'état pur en grandes quantités. Les serpentinites contiennent souvent plusieurs polymorphes de serpentines, par exemple des veines de chrysotile entre les cristaux de lizardite. Nous sommes donc limités en quantité pour ce minéral et n'avons pas réalisé les mesures qui nécessitent beaucoup de matériel telle la mesure de surface spécifique. La poudre de lizardite a été calibrée en taille par Elodie Amiguet, post-doctorante au LGL-TPE, pour ses propres travaux; nous utilisons la fraction $< 100 \mu\text{m}$.

Deux smectites riches en fer, les nontronites NAu1 et NAu2 d'Australie, ont également été testées. Enfin, deux montmorillonites bien caractérisées, SWy2 et SAZ1 provenant respectivement du Wyoming et d'Arizona, ont été étudiées en tant que référence aux précédents travaux sur l'adsorption d'ADN/ARN sur les surfaces minérales (Banin, Lawless et al. 1985; Ferris, Ertem et al. 1989; Ertem and Ferris 1998).

Les nontronites et montmorillonites nous ont été fournies par le Laboratoire Environnement et Minéralurgie (Nancy) sous forme de suspensions après échange ionique au Na^+ et tri en taille.

Les particules ont été caractérisées en taille et géométrie par microscopie électronique à transmission (**Figure II - 2**).

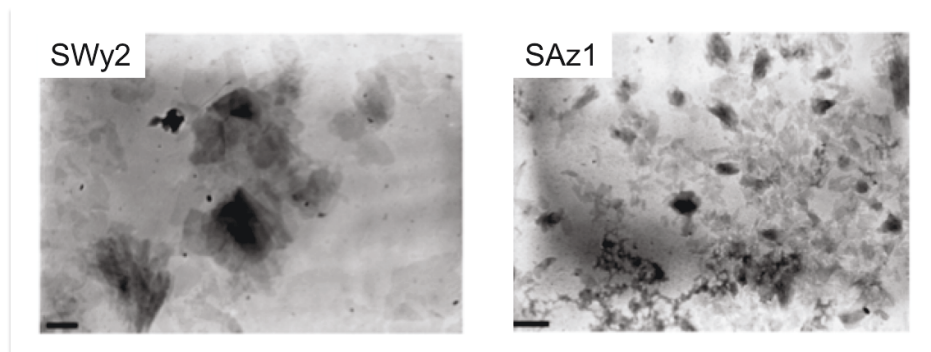


Figure II - 2 : Images MET des suspensions de SWy2 et SAz1 utilisées lors de cette étude (Paineau, Bihannic et al. 2011)

Les particules de montmorillonites SWy2 et SAz1 ont la forme de pseudo-disques, tandis que les nontronites ont la forme de lamelles. Les dimensions mesurées sont listées dans le **Tableau II - 3**.

Tableau II - 3 : Dimensions en nm des argiles gonflantes mesurées par MET.

Abr.	Diamètre	Longueur	Largeur	Hauteur
SWy2	240 ^a	-	-	0.8 ^a
SAz1	150 ^a	-	-	0.7 ^a
NAu1	-	460 ^b	60 ^b	0.76 ^b
NAu2	-	368 ^b	93 ^b	1 ^b

a : (Paineau, Bihannic et al. 2011); b : (Michot in prep)

Les montmorillonites et nontronites ont subi une étape de dessiccation, puis le résidu solide a été dispersé au mortier afin d'obtenir une poudre.

II. Caractérisation des surfaces minérales

Les propriétés de surfaces des minéraux étudiés ont été caractérisées au LEM, Laboratoire Environnement et Minéralurgie, à Nancy.

II.1. Surfaces spécifiques

II.1.1. Mesure par volumétrie point par point

La surface spécifique des échantillons de pyrophyllite, chlorite, et chrysotile a été mesurée par acquisition d'isothermes d'adsorption/désorption de gaz N₂ par volumétrie point par point.

L'échantillon pesé est préalablement dégazé à chaud sur une rampe à vide pendant 12h. Une surface expérimentale approximative de 5 m² dans l'ampoule est recommandée pour obtenir une valeur fiable. L'ampoule contenant l'échantillon est ensuite connectée à l'appareil de volumétrie point par point mis au point au LEM, et est plongée dans de l'azote liquide à 77K, dont le niveau est maintenu constant tout au long de la manipulation. Du gaz N₂ est introduit « point par point » dans le système. A chaque introduction de gaz successive, la pression est mesurée avant et après détente du gaz sur l'échantillon, à l'équilibre. La différence de pression correspond à la quantité de diazote adsorbée à la surface du minéral. Le système de mesure comprend toutefois un volume non négligeable de verrerie (ampoule, tuyaux, capillaires) contenant du gaz qui n'est pas impliqué dans l'adsorption en surface du minéral. Ce « volume mort » est mesuré en fin de manipulation et inclus dans le calcul afin de ne pas fausser les mesures.

Connaissant la surface occupée par une molécule de N₂, la surface spécifique est calculée par la méthode BET (Brunauer, Emmett et Teller (Brunauer, Emmett et al. 1938)). Nous utilisons une surface caractéristique de 16.3 Å² pour la molécule de N₂ (Greggs 1982).

Les surfaces spécifiques BET de Pyr., Chlor. et Chrys. sont listées dans le **Tableau II – 4** (paragraphe suivant). Notre stock de lizardite pure, limité à 480 mg, ne permettait pas une mesure de surface spécifique fiable.

II.1.2. Mesure du facteur de forme par volumétrie basse pression

Une surface minérale est hétérogène et composée de sites d'énergies différentes. Cette hétérogénéité influence grandement les phénomènes d'adsorption physiques comme l'adsorption de gaz, qui peut par conséquent être utilisée afin de caractériser précisément la surface. En réalisant des isothermes d'adsorption de gaz, azote ou argon, à faible pression, on peut ainsi déterminer la proportion relative de sites latéraux, sites de plus hautes énergies, et de sites basaux de moins haute énergie (Villieras, Cases et al. 1992).

Les échantillons sont dégazés sous vide à chaud. L'échantillon est ensuite placé dans un bain d'azote liquide dont le niveau est maintenu constant durant toute la manipulation. L'introduction du gaz Argon se fait en continu à très faible débit. On considère ainsi que l'échantillon est constamment en équilibre avec la phase gazeuse ; l'isotherme d'adsorption est acquise dans le domaine de la monocouche ($P/P_0 < 0,15$). On travaille ensuite sur la dérivée de l'isotherme expérimentale obtenue, en la reconstituant comme combinaison d'isothermes locales pour chaque type de site (**Figure II – 3**). Les sites de haute énergie, ou de $\ln P/P_0$ très négatifs, sont identifiés comme appartenant aux faces latérales, ceux de basse énergie, ou de $\ln P/P_0$ moins négatifs, appartiennent aux faces basales.

Ces mesures ont été réalisées pour la chlorite, la pyrophyllite, la lizardite et le chrysotile. Les surfaces latérales des minéraux étudiés ont été calculées en considérant la proportion de sites de haute énergie et sont listées dans le **Tableau II - 4**.

Pour Pyr., Chor. et Chrys., où les surfaces ont été mesurées à la fois par volumétrie point par point et par volumétrie basse pression, les valeurs de surface spécifique totale sont en bon accord.

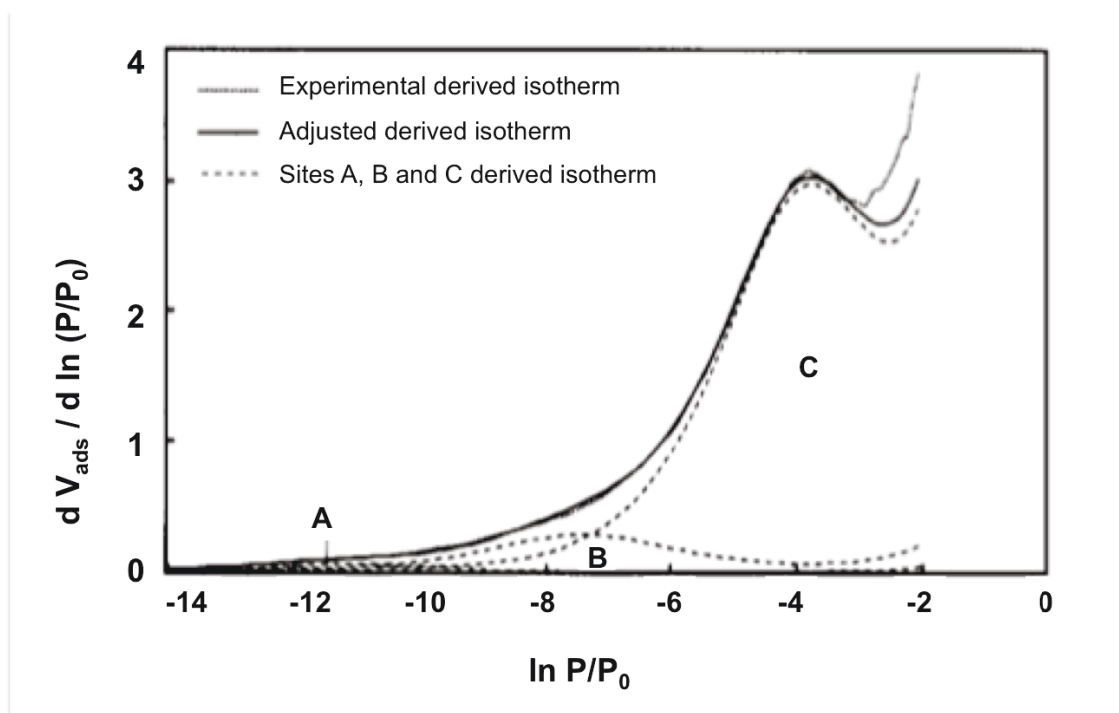


Figure II – 3 : Dérivée d’une isotherme d’adsorption expérimentale type (Argon à 77K, surface de kaolinite). Elle est décomposée en trois types de sites A, B et C. A et B correspondent aux faces latérales et C aux faces basales (modifié d’après Villieras et al., 1992).

Tableau II – 4 : Surfaces spécifiques obtenues par volumétrie point par point et par volumétrie basse pression pour Pyr., Chlor., Liz. et Chrys.

Minéral	Surface (m ² /g)				
	Totale	% Lat.	Basale	Latérale	Totale BET
Pyr.	4,3	25	3,2	1,1	4,5
Chlor.	5,7	32	4,1	2,2	7
Liz	2,7	36	1,7	1	-
Chrys.	16,5	7	16	1,3	19,1

II.1.3. Calcul des surfaces spécifiques des argiles gonflantes

Les mesures de surface spécifique par adsorption de gaz ne sont pas adaptées aux argiles gonflantes, ou smectites. En effet, ces mesures se font sur des poudres sèches. Or, la surface spécifique d'une argile gonflante dépend fortement de l'état d'hydratation du minéral, ainsi que de la force ionique. A force ionique $< 10^{-3}$ M, des feuillets isolés sont présents en suspension (Michot, Bihannic et al. 2006; Paineau, Bihannic et al. 2011), l'argile est totalement développée. Plus la force ionique est forte, plus les particules coagulent, modifiant ainsi la surface spécifique réelle (Lagaly and Ziesmer 2003; Lagaly 2006). Le nombre total de particules en suspensions diminue (Thomas, Michot et al. 1999), et par conséquent la surface spécifique disponible en suspension décroît. Nos expériences sont réalisées à forte force ionique [0,5 M de NaCl ; 0,05 M $MgCl_2$], ce qui est supérieur à la concentration dite critique de coagulation en électrolyte comprise entre 3 et 20 mM pour le NaCl (Lagaly 2006). Dans nos conditions expérimentales les particules d'argiles sont donc coagulées (Lagaly 2006; Michot, Bihannic et al. 2006), et la surface mesurée par adsorption de gaz n'aurait pas été informative.

Plusieurs modes de coagulation sont possibles: face – face, face – bord, ou bord – bord (Figure II – 4).

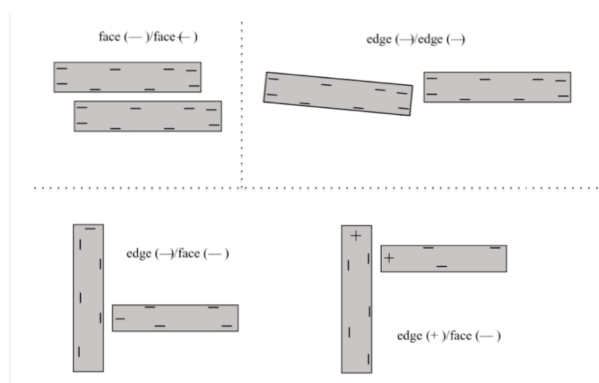


Figure II – 4 : Modes de coagulation des particules d'argiles en suspension (d'après Lagaly et al., 2003)

La configuration bord-bord est favorisée à forte concentration solide. La configuration face – bord est a priori favorisée à bas pH (Lagaly and Ziesmer 2003; Tombacz and Szekeres 2004; Lagaly 2006; Michot in prep). Cependant, ce type d'agrégation ne représente pas un minimum d'énergie (Meyer, Levitz et al. 2001; Jonsson, Labbez et al. 2008). De fortes salinités, ainsi qu'un pH plus élevé, avantagent la configuration face-face. De récentes mesures de SAXS (Small Angle X-ray Scattering) et de microscopie X à transmission (STXM) ont montré que cette dernière configuration est dominante (Michot in prep).

En considérant que la configuration face-face est observée dans nos expériences, la surface latérale réelle correspond à la surface latérale maximale, déduite des dimensions des feuillets isolés (**partie I.2.**). La surface basale maximale est également déduite de ces dimensions. Elle ne correspond pas exactement à la surface spécifique disponible en suspension dans nos conditions expérimentales. L'application de la formule de Scherrer nous permet de savoir qu'à cette force ionique, une particule contient en moyenne 4 feuillets (Michot in prep). La surface spécifique basale réellement disponible en solution est donc la surface basale maximale divisée par un facteur 4.

Nous avons donc calculé les surfaces spécifiques maximales et réelles des montmorillonites et nontronites à partir des dimensions des particules mesurées par microscopie électronique à transmission (Michot, Baravian et al. 2009; Paineau, Bihannic et al. 2011) ; elles sont listées dans le **Tableau II - 5**.

Tableau II – 5 : Surfaces spécifiques calculées pour les argiles gonflantes

Abr.	Densité	Surface (m ² /g)			
		Basale max.	Latérale	Totale max.	Totale réelle
SWy2	2,71	920± 30	6±1	926±30	236±30
SAz1	2,7	1050± 40	10±1	1060±40	272±40
NAu1	2,9	910 ± 30	13±2	923±30	240±30
NAu2	2,9	690±20	9±1	700±20	180±20

II.2. Capacité d'Echange Cationique (CEC)

La capacité d'échange cationique (CEC) reflète la charge structurale du phyllosilicate analysé.

Les CEC sont mesurées par échange des cations intercalaires avec complexe cobaltihexamine $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$.

Le principe est le suivant : un échantillon du minéral étudié est mis en suspension dans une solution de cobaltihexamine (30 ml, 0.05 eq/l) ayant été préparée la veille. Le mélange est maintenu à 30°C sous agitation pendant 2h puis centrifugée. On dose la concentration de cobaltihexamine par colorimétrie en mesurant l'absorption du cobalt à 473 nm par spectrophotométrie UV-visible.

La concentration est déterminée par la loi de Beer Lambert :

$$A = K C l$$

où A est l'absorbance mesurée à 473 nm, K le coefficient d'absorbance spécifique, C la concentration en cobaltihexamine et l l'épaisseur de la cuve.

La CEC est obtenue grâce à la formule suivante :

$$\text{CEC} = (C_i - C_f) (V/m) \times 100$$

où C_i est la concentration initiale en ions cobaltihexamine (0.05 eq/l), C_f la concentration

finale dans le surnageant, V le volume de solution en ml et m la masse de l'échantillon en g.

Les valeurs de CEC mesurées sont listées dans le **Tableau II – 6**. La CEC est exprimée en meq/100g. Un meq correspond à 1 mmole.

Tableau II – 6 : Capacités d'échange cationique des phyllosilicates étudiés.

Minéral	NAu1	NAu2	SWy2	SAz1	Pyr.	Chlor	Liz.	Chrys
						.		.
CEC (meq/100g)	113*	89*	89	128	0,3	2,1	-	0,2

Les argiles non gonflantes et les serpentines, qui n'ont pas de charge structurale permanente, présentent des CEC quasi nulles.

Les argiles gonflantes présentent des CEC élevées. NAu1 et SAz1 ont des CEC plus fortes que NAu2 et SWy2, ce qui indique une charge structurale permanente.

II.3. Potentiel Zeta, ou potentiel électrocinétique

II.3.1. Définition

Le potentiel zeta indique la charge globale des particules en suspension.

Une particule de phyllosilicate en suspension est entourée de couches ioniques, qui contrebalancent sa charge. Typiquement, on considère un modèle en deux couches, ou modèle de Stern-Gouy-Chapman (Gouy 1910; Chapman 1913; Stern 1924). La charge de la particule colloïdale est compensée par des ions organisés en :

- une couche dense comprenant des molécules d'eau structurées ainsi que des ions à forte interaction avec la surface : c'est la couche de Stern
- une couche diffuse, formant autour de la particule un nuage ionique, qui compense la charge résiduelle : c'est la couche de Gouy-chapman

Le potentiel zéta est le potentiel mesuré en surface de la couche de Stern (**Figure II - 5**).

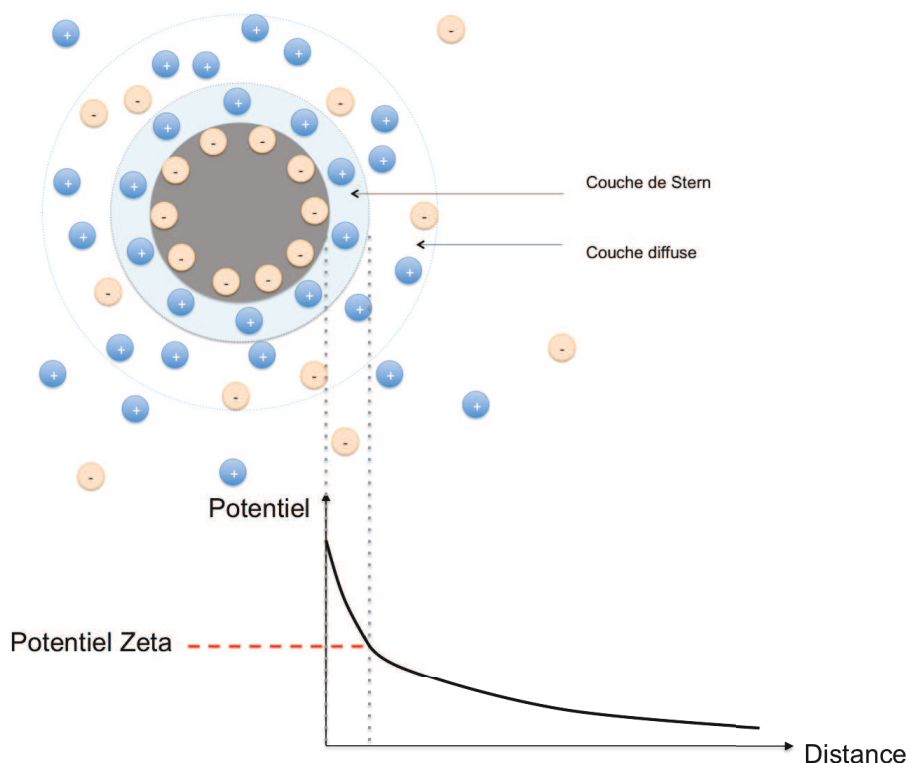


Figure II - 5 : Modèle de la double-couche électrique et définition du potentiel zéta : cas d'une particule négativement chargée (d'après Vantelon, thèse)

L'adsorption d'espèces moléculaires sur les particules modifie la double-couche électrique. Des modèles plus complexes comme celui de la triple couche électrique (ETL) ont donc vu le jour et prennent en compte l'adsorption par formation de liaisons ou complexes de coordination (Sahai and Sverjensky 1998; Sverjensky and Fukushima 2006; Jonsson, Jonsson et al. 2009).

II.3.2. Protocole

Le potentiel zeta est obtenu à partir de la mobilité électrophorétique des particules. Celle-ci est mesurée dans le plan stationnaire d'une cellule d'électrophorèse à différents pH et forces ioniques sous l'application d'un champ électrique. L'appareil utilisé est un zetaphoremètre IV de CAD instrumentation™. Un détecteur CCD capture les trajectoires des particules,

analysées grâce à un logiciel de traitement d'image. Le potentiel zéta est calculé à partir de la mobilité par l'équation de Smoluchowski (Van Olphen 1977).

Les mesures ont été réalisées à température ambiante dans des solutions de NaCl ou de NaNO₃ à force ionique 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M et 10⁻⁵ M. Le pH est ajusté par ajout d'acide chlorhydrique HCl ou de soude NaOH.

II.3.3. Résultats

Le potentiel Zeta a été mesuré en fonction du pH pour 6 minéraux (**Figure II – 6**). NAl, Liz., Chlor., Pyr. ont été étudiés dans des solutions de NaCl de concentration 10⁻² à 10⁻⁴ M. SWy2 et SAz1 ont été étudiés dans des solutions de NaNO₃ en concentration 10⁻³ à 10⁻⁵ M.

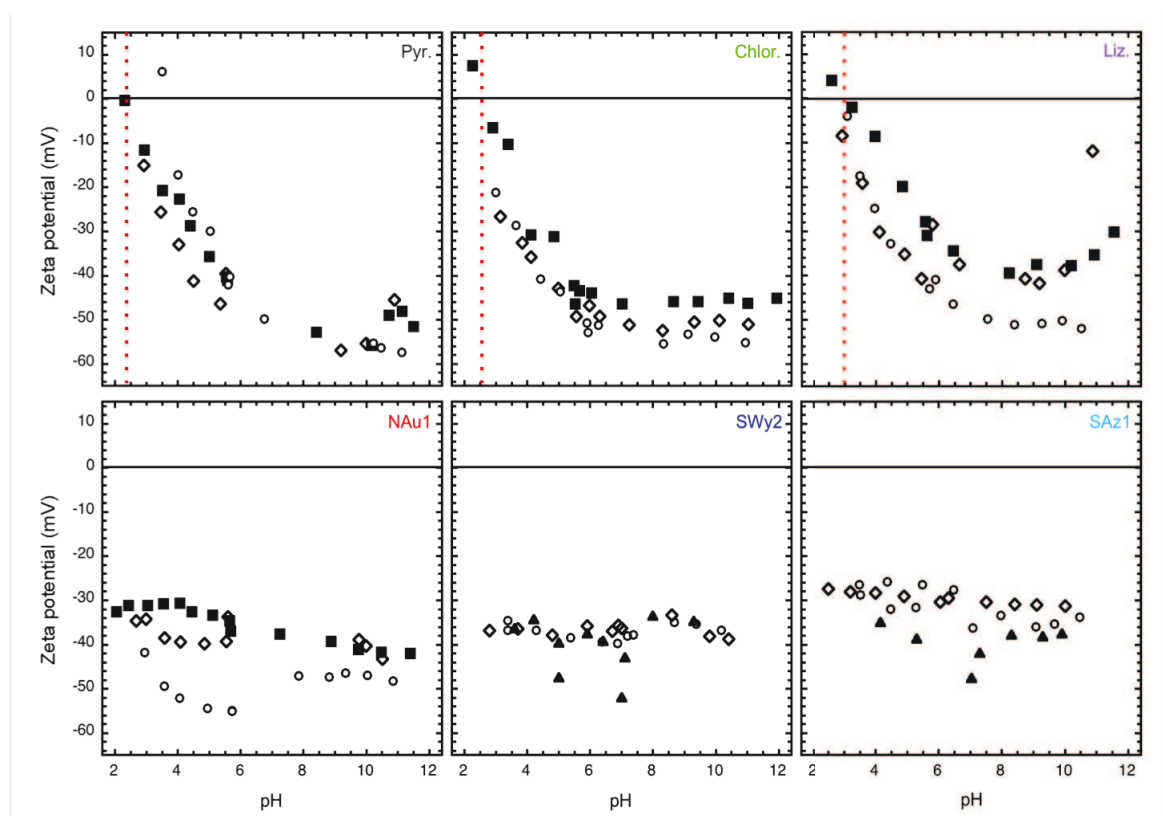


Figure II – 6 : Evolution du potentiel zeta des phyllosilicates étudiés en fonction du pH à différentes forces ioniques. Carrés = 10⁻² M ; Diamants = 10⁻³ M, Ronds = 10⁻⁴ M, Triangles = 10⁻⁵ M. Le point de zéro charge est marqué par une ligne pointillée rouge. Electrolytes utilisés = NaCl (Pyr., Chlor., Liz., NAl) ; NaNO₃ (SWy2 et SAz1).

Deux comportements distincts sont observés. Le potentiel zeta de la pyrophyllite, de la chlorite et de la lizardite augmente lorsque le pH diminue. Il atteint un point de charge zéro, ou point isoélectrique, à 2.5, 2.5 et 3 unités pH, respectivement. La charge globale de surface de ces minéraux est donc négative à pH élevé, puis au dessous de pH 6 leur charge augmente pour devenir positive aux alentours de pH 2.5. Ces minéraux n'ont pas de charge structurale, et les sites amphotériques Si-OH et Al-OH des faces latérales ont donc ici une influence dominante sur la charge globale.

Les argiles gonflantes, NAu1, SWy2 et SAz1, réagissent différemment aux variations de pH. Leur potentiel zeta est quasi-constant et négatif sur la gamme de pH étudiée. Ces minéraux ont donc une charge négative permanente quel que soit le pH. Les sites amphotériques des faces latérales n'ont donc que peu ou pas d'influence sur la charge globale du minéral. Elle est liée à la charge structurale des feuillets, due aux substitutions isomorphes des Si^{4+} et Al^{3+} par des cations de moindre valence.

La force ionique a peu d'effet sur le potentiel zeta des phyllosilicates étudiés. Les courbes sont quasi-superposées. On distingue une légère tendance : plus la force ionique est élevée, moins le potentiel zeta est négatif.

II.4. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X permet de déterminer la structure du minéral à l'échelle de la maille cristallographique. Pour les phyllosilicates, la mesure de la distance interfoliaire est particulièrement importante.

Les rayons X sont diffusés par la matière. Dans les solides cristallins, les atomes sont organisés de façon périodique, et la quantité de rayonnement diffusée est plus importante dans certaines directions, lorsque les diffusions sont en phase. C'est la diffraction des rayons X (DRX).

La loi de Bragg permet de déterminer les distances caractéristiques du minéral étudié :

$$\lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta$$

où λ est la longueur d'onde des rayons X incidents, θ l'angle de réflexion et d_{hkl} la distance interréticulaire entre les plans cristallographiques (hkl).

Nous utilisons la DRX afin de déterminer si l'adsorption des nucléotides induit une variation de l'espace interfoliaire pouvant permettre de trancher en faveur ou en défaveur d'une adsorption de nucléotides dans l'espace interfoliaire des argiles.

Des diffractogrammes de référence ont été acquis sur des poudres non-orientées. Pour les échantillons avant-après adsorption, la quantité de matériel est trop faible. Ils ont donc été analysés sur des portoirs en silicium et sont par conséquent orientés. Un exemple de diffractogramme est présenté en **Figure II – 7**.

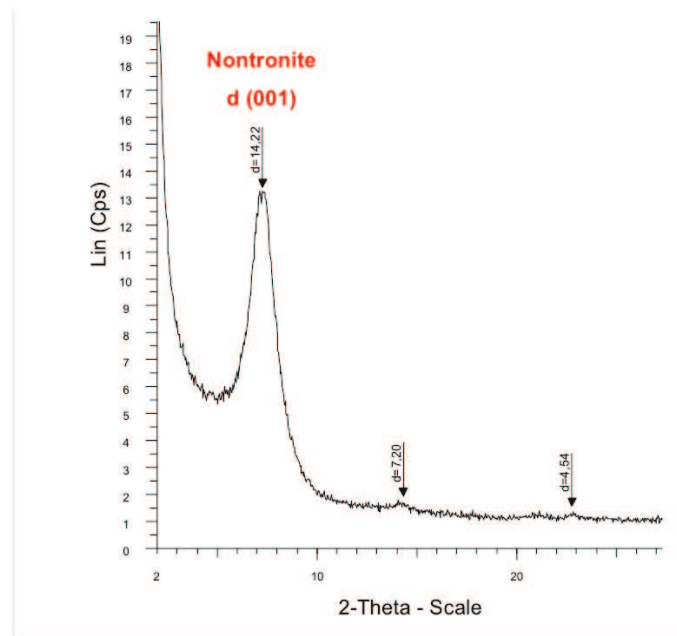


Figure II - 7 : Exemple de diffractogramme obtenu pour un échantillon de nontronite NAl1 sur portoir en silicium. Le plan d (001) domine le signal.

II.5. Spectroscopie Infra Rouge en transmission

La spectroscopie infrarouge est une spectroscopie vibrationnelle, de même que la spectroscopie Raman largement développée dans la première partie de cette thèse. Elle est beaucoup plus sensible que la spectroscopie Raman pour l'analyse de molécules organiques.

Un échantillon de minéral est pesé (moins d'1 mg pour les argiles) et mélangé à du KBr anhydre stocké à l'étuve à 80°C. Le mélange est homogénéisé au mortier puis placé dans un moule à pastilles. La pastille est obtenue par application d'une pression de 10 tonnes/cm². Légèrement transparente, la pastille est placée dans le spectromètre Infrarouge puis analysée en transmission.

III. Protocole d'adsorption des acides nucléiques sur les surfaces des phyllosilicates

Chaque expérience et mesures ont été dupliquées.

III.1. Protocole expérimental

Un échantillon de minéral est pesé puis placé dans un tube Eppendorf de 2 ml. On ajoute 1 ml de solution saline contenant le nucléotide en concentration connue. La teneur en minéral de toutes nos expériences est comprise entre 2 et 4 g/l.

Après homogénéisation, le mélange {nucléotides + minéral} est maintenu 24h à température constante, protégé de la lumière. La concentration en nucléotides dans le surnageant est mesurée par absorption UV à 260 nm après centrifugation pendant 25 minutes à 13200 rpm (16100 g). La quantité de nucléotides adsorbée par le minéral est la différence entre les concentrations de nucléotides dans le surnageant avant et après adsorption. Des contrôles négatifs ont été réalisés à chaque étape afin de s'assurer qu'il n'y a eu aucune contamination.

Nous utilisons pour les mesures de concentration un Nanodrop™ 1000 disponible à l'IGFL (**Figure II – 8**). Ce spectromètre miniaturisé est conçu spécialement pour des mesures de

concentrations en acides nucléiques. La concentration de nucléotides présents est dosée rapidement grâce à l'interface très simple d'utilisation à partir de 2 µl d'échantillon seulement (Figure II – 8).

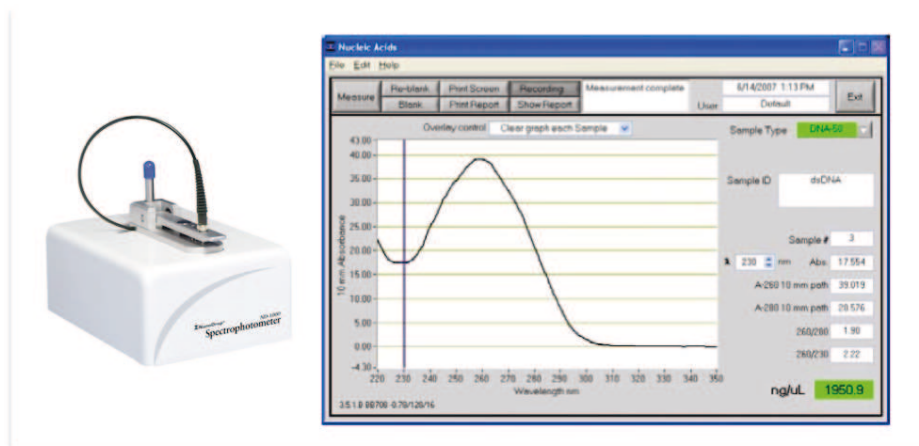


Figure II – 8 : Spectromètre Nanodrop utilisé, et pic d'absorption à 260 nm.

La concentration en acide nucléique est calculée selon la loi de Beer-Lambert :

$$C = (A * e)/b$$

où C , concentration en ng/µl est obtenue en fonction de A , l'absorbance à 260 nm, e le coefficient d'extinction des acides nucléiques en ng-cm/µl et b la longueur du trajet des rayons lumineux.

Les coefficients d'extinction de l'ADN simple-brin et de l'ARN simple-brin, étudiés dans notre étude, sont de 33 et 40 ng-cm/µl, respectivement.

III.2. Paramètres physico-chimiques testés

III.2.1. Salinité

Comme nous l'avons vu en introduction, la salinité de l'océan Hadéen/Archéen est encore peu contrainte mais est supposée comprise entre la salinité actuelle 0.55 M et 2 fois cette salinité. L'effet de la salinité a été étudié pour des salinités comprises entre 0 et 1 M. Seuls les sels les

plus abondants dans l'eau de mer actuelle, *i.e.* NaCl et MgCl₂ ont été utilisés en proportions relatives constantes (90% NaCl, 10% MgCl₂). Nous n'étudions pas l'effet de la valence des cations mis en évidence par Franchi et al. (2003).

Pour les argiles gonflantes, nous n'avons pas pu appliquer le protocole standard, puisqu'à force ionique nulle, les argiles gonflantes sont totalement déployées jusqu'au stade du feuillet isolé, impossible à séparer du surnageant en utilisant la centrifugeuse Eppendorf 5415 D dont nous disposons au laboratoire, qui tourne au maximum à 13 200 rpm atteignant ainsi 16100 g. Des filtres micro-poreux ont donc été utilisés afin de retirer les particules de la solution ; ils se fixent sur des seringues de 1 ml et possèdent des pores d'un diamètre de 0,1 µm, suffisamment étroits pour retenir les particules d'argile. Les filtres MilliPore sont cependant assez fragiles et il faut donc prendre soin de ne pas brusquer la filtration.

Ces filtres ont été utilisés avec succès pour des suspensions de SWy2 et NAu2.

III.2.2. Température

Nous avons étudié l'adsorption des nucléotides selon une large gamme de température entre 4° et 95°C, qui encadre la gamme de températures proposées pour l'océan Hadéen/Archéen.

Au delà de la température ambiante, nous avons travaillé dans des étuves Memmert™. Pour les températures inférieures, nous avons utilisé un bain thermostaté et des réfrigérateurs.

III.2.3. pH

Le pH de l'océan Hadéen/Archéen est supposé être proche de 5,5 (Macleod, Mckeown et al. 1994). Cependant, le pH varie beaucoup notamment au niveau des sources hydrothermales. On trouve par exemple des fluides hydrothermaux à pH inférieur à 3 au niveau des fumeurs noirs (Charlou, Donval et al. 2002). Les fumeurs blancs, comme Lost City (Kelley, Karson et al. 2005), et les volcans de boues de serpentinites présentent eux des fluides hydrothermaux

plus alcalins avec des pH entre 9 et 12 (Mottl, Komor et al. 2003).

Nous avons donc étudié une gamme de pH large, entre 1 et 11. Pour cela, nous avons utilisé des solutions d'acide chlorhydrique HCl et de soude NaOH afin d'ajuster le pH des solutions nucléotidiques. Le pH est mesuré avant et après l'adsorption afin de noter une éventuelle variation du pH. Le pH est mesuré dans les tubes Eppendorf™ avec une sonde InLab Micro™ associée à un pH mètre Metler Toledo™.

Références bibliographiques

- Banin, A., J. G. Lawless, et al. (1985). "Ph Profile of the Adsorption of Nucleotides onto Montmorillonite .2. Adsorption and Desorption of 5'-Amp in Iron-Calcium Montmorillonite Systems." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **15**(2): 89-101.
- Breslow, R. and Z. L. Cheng (2009). "On the origin of terrestrial homochirality for nucleosides and amino acids." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(23): 9144-9146.
- Brunauer, S., P. H. Emmett, et al. (1938). "Adsorption of gases in multimolecular layers." Journal of the American Chemical Society **60**: 309-319.
- Chapman, D. L. (1913). "A contribution to the theory of electrocapillarity." Phil Mag. **25**(6): 475-481.
- Charlou, J. L., J. P. Donval, et al. (2002). "Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36 degrees 14 ' N, MAR)." Chemical Geology **191**(4): 345-359.
- Danyluk, S. S., Hruska, F.E. (1968). "The effect of pH upon the nuclear magnetic resonance spectra of nucleosides and nucleotides." Biochemistry **7**(3).
- Dawson, R., Elliott, D., Elliot, W., Jones, K. (1986). Data for biochemical research.
- Dworkin, M. and K. H. Keller (1977). "Solubility and Diffusion-Coefficient of Adenosine 3'=5'-Monophosphate." Journal of Biological Chemistry **252**(3): 864-865.
- Ertem, G. and J. P. Ferris (1998). "Formation of RNA oligomers on montmorillonite: site of catalysis." Orig Life Evol Biosph **28**(4-6): 485-499.
- Ferris, J. P., G. Ertem, et al. (1989). "The Adsorption of Nucleotides and Polynucleotides on Montmorillonite Clay." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **19**(2): 153-164.
- Franchi, M., J. P. Ferris, et al. (2003). "Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **33**(1): 1-16.
- Gates, W. P., P. G. Slade, et al. (2002). "Site occupancies by iron in nontronites." Clays and Clay Minerals **50**(2): 223-239.
- Gouy, G. (1910). "Sur la contribution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte." Ann. Phys. **4**(9): 457-468.
- Greggs, S. J., Sing, K.S.W (1982). Adsorption, Surface Area and Porosity.
- Jonsson, B., C. Labbez, et al. (2008). "Interaction of Nanometric Clay Platelets." Langmuir **24**(20): 11406-11413.
- Jonsson, C. M., C. L. Jonsson, et al. (2009). "Attachment of L-Glutamate to Rutile (alpha-TiO₂): A Potentiometric, Adsorption, and Surface Complexation Study." Langmuir **25**(20): 12127-12135.
- Kelley, D. S., J. A. Karson, et al. (2005). "A serpentinite-hosted ecosystem: the Lost City hydrothermal field." Science **307**(5714): 1428-1434.
- Lagaly, G. (2006). "Colloid clay science." Developments in clay science **1**: 141-245.
- Lagaly, G. and S. Ziesmer (2003). "Colloid chemistry of clay minerals: the coagulation of montmorillonite dispersions." Advances in Colloid and Interface Science **100**: 105-128.
- Macleod, G., C. Mckeown, et al. (1994). "Hydrothermal and Oceanic Ph Conditions of Possible Relevance to the Origin of Life." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **24**(1): 19-41.
- Martin, R. B. (1985). "Nucleoside Sites for Transition-Metal Ion Binding." Accounts of

- Chemical Research **18**(2): 32-38.
- Mellini, M. and C. Viti (1994). "Crystal-Structure of Lizardite-1t from Elba, Italy." American Mineralogist **79**(11-12): 1194-1198.
- Meyer, S., P. Levitz, et al. (2001). "A (N,V,T) Monte Carlo study of the long-range electrostatic coupling between a large collection of charged colloidal platelets." Journal of Physical Chemistry B **105**(39): 9595-9602.
- Michot, L., Bihannic, I., Thomas, F., Lartiges, B.S., Waldvogel, Y., Caillet, C., Thieme, J., Funari, S.S., Levitz, P. (in prep). "Coagulation of Na-montmorillonite by Inorganic Cations. A combined Transmission X-Ray microscopy, Small Angle and Wide Angle X-ray Scattering Study."
- Michot, L. J., C. Baravian, et al. (2009). "Sol-Gel and Isotropic/Nematic Transitions in Aqueous Suspensions of Natural Nontronite Clay. Influence of Particle Anisotropy. 2. Gel Structure and Mechanical Properties." Langmuir **25**(1): 127-139.
- Michot, L. J., I. Bihannic, et al. (2006). "Liquid-crystalline aqueous clay suspensions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(44): 16101-16104.
- Mottl, M. J., S. C. Komor, et al. (2003). "Deep-slab fuel extremophilic Archaea on a Mariana forearc serpentinite mud volcano: Ocean Drilling Program Leg 195." Geochemistry Geophysics Geosystems **4**.
- Orgel, L. E. (2004). "Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **39**(2): 99-123.
- Paineau, E., I. Bihannic, et al. (2011). "Aqueous Suspensions of Natural Swelling Clay Minerals. 1. Structure and Electrostatic Interactions." Langmuir **27**(9): 5562-5573.
- Prabakar, K. J. and J. P. Ferris (1997). "Adenine derivatives as phosphate-activating groups for the regioselective formation of 3',5'-linked oligoadenylates on montmorillonite: Possible phosphate-activating groups for the prebiotic synthesis of RNA." Journal of the American Chemical Society **119**(19): 4330-4337.
- Sahai, N. and D. A. Sverjensky (1998). "GEOSURF: A computer program for modeling adsorption on mineral surfaces from aqueous solution." Computers & Geosciences **24**(9): 853-873.
- Stern, O. (1924). "Zür theorie der electrolytischen doppelschicht." Z. Elektrochem **30**: 508-516.
- Sverjensky, D. A. and K. Fukushi (2006). "Anion adsorption on oxide surfaces: Inclusion of the water dipole in modeling the electrostatics of ligand exchange." Environmental Science & Technology **40**(1): 263-271.
- Tetko, I. V. (2005). "Computing chemistry on the web." Drug Discovery Today **10**(22): 1497-1500.
- Tetko, I. V., J. Gasteiger, et al. (2005). "Virtual computational chemistry laboratory - design and description." Journal of Computer-Aided Molecular Design **19**(6): 453-463.
- Thomas, F., L. J. Michot, et al. (1999). "Layer charge and electrophoretic mobility of smectites." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **159**(2-3): 351-358.
- Tombacz, E. and M. Szekeres (2004). "Colloidal behavior of aqueous montmorillonite suspensions: the specific role of pH in the presence of indifferent electrolytes." Applied Clay Science **27**(1-2): 75-94.
- Van Olphen, H. (1977). An Introduction to Clay Colloid Chemistry. New York.
- Villieras, F., J. M. Cases, et al. (1992). "Texture and Surface Energetic Heterogeneity of Solids from Modeling of Low-Pressure Gas-Adsorption Isotherms." Langmuir **8**(7): 1789-1795

Chapitre 3

Adsorption de nucléotides sur les phyllosilicates ferromagnésiens : Résultats

Dans ce chapitre sont présentés les données d'adsorption. La même légende sera utilisée pour toutes les figures : chaque minéral est représenté par une couleur, chaque nucléotide par un symbole, indiqués dans la légende ci-dessous.

Figurés et couleurs adoptés au cours de ce chapitre

Nucléotides		Phyllosilicates	
○	AMP	■ NAu1	■ Pyr.
◇	CMP	■ NAu2	■ Chlor.
□	UMP	■ SWy2	■ Liz.
△	GMP	■ SAz1	■ Chrys.
▽	dGMP		

I. Isothermes d'adsorption

Un récapitulatif des isothermes d'adsorption mesurées est présenté dans le **Tableau III -1**.

Tableau III – 1 : Récapitulatif des isothermes d'adsorption réalisées à pH naturel (*i.e.* 6.5 environ)

Minéral	NAu1	NAu2	SWy2	SAz1	Pyr.	Chlor.	Liz.	Chrys.
AMP	+	-	+	-	+	-	-	-
CMP	+	+	+	+	+	+	+	+
GMP	+	+	+	+	+	+	+	+
UMP	+	-	+	-	+	+	-	+
dGMP	+	-	+	-	+	-	-	-

Notre étude s'articule autour de 8 phyllosilicates NAu1, NAu2, SWy2, SAz1, Pyr., Chlor., Liz. et Chrys. Tous ont fait l'objet d'une étude systématique de l'adsorption des nucléotides CMP et GMP. Deux ont été testés avec GMP, CMP et UMP : Chlor. et Chrys. Enfin, trois d'entre eux ont été testés avec les 5 nucléotides : NAu1, SWy2 et Pyr.

Les isothermes d'adsorption mesurées pour chaque minéral sont représentées en **Figure III – 1** en $\mu\text{mol/g}$.

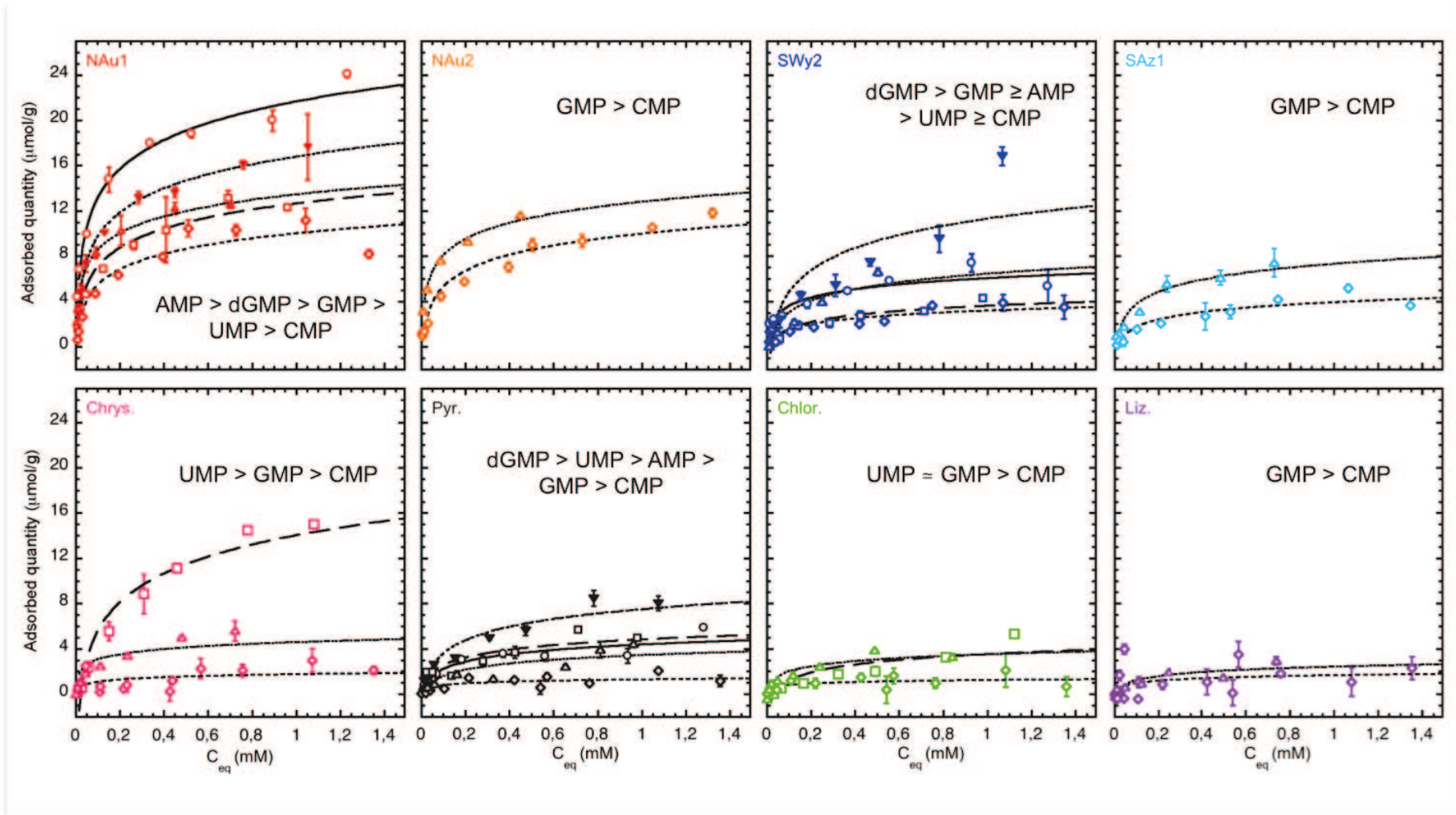


Figure III – 1 : Isothermes d'adsorption obtenues sur les minéraux étudiés. Ronds = AMP ; carrés = UMP ; losanges = CMP ; triangle = GMP ; triangle renversé = dGMP. Les barres d'erreur sont comprises dans la taille des symboles quand elles ne sont pas visibles. Les courbes sont des guides pour les yeux.

I.1. Adsorption différentielle des nucléotides sur une même surface

On observe une adsorption différentielle des nucléotides pour chaque surface. Cela est particulièrement évident pour SWy2, NAu1 et Pyr., où l'adsorption des 5 nucléotides a été étudiée. Sur NAu1 par exemple, les nucléotides s'adsorbent dans l'ordre croissant $CMP < UMP < GMP < dGMP < AMP$. L'ordre observé est légèrement différent pour les surfaces de montmorillonites SWy2 : $CMP < UMP < AMP < GMP < dGMP$. Sur la surface de pyrophyllite Pyr., on observe $CMP < GMP < AMP < UMP < dGMP$.

Sur toutes les surfaces, la pyrimidine CMP s'adsorbe le moins, tandis que les purines AMP, GMP et dGMP s'adsorbent d'avantage. Le chrysotile fait exception à cette règle puisque le nucléotide adsorbé en plus grande quantité est l'UMP.

On note également que les désoxyribonucléotides dGMP s'adsorbent systématiquement plus que les ribonucléotides GMP (**Figure III-1**).

I.2. Adsorption différentielle sur les minéraux étudiés

Les isothermes d'adsorption de GMP et CMP sur les 8 phyllosilicates étudiés sont représentées en **Figure III – 2**.

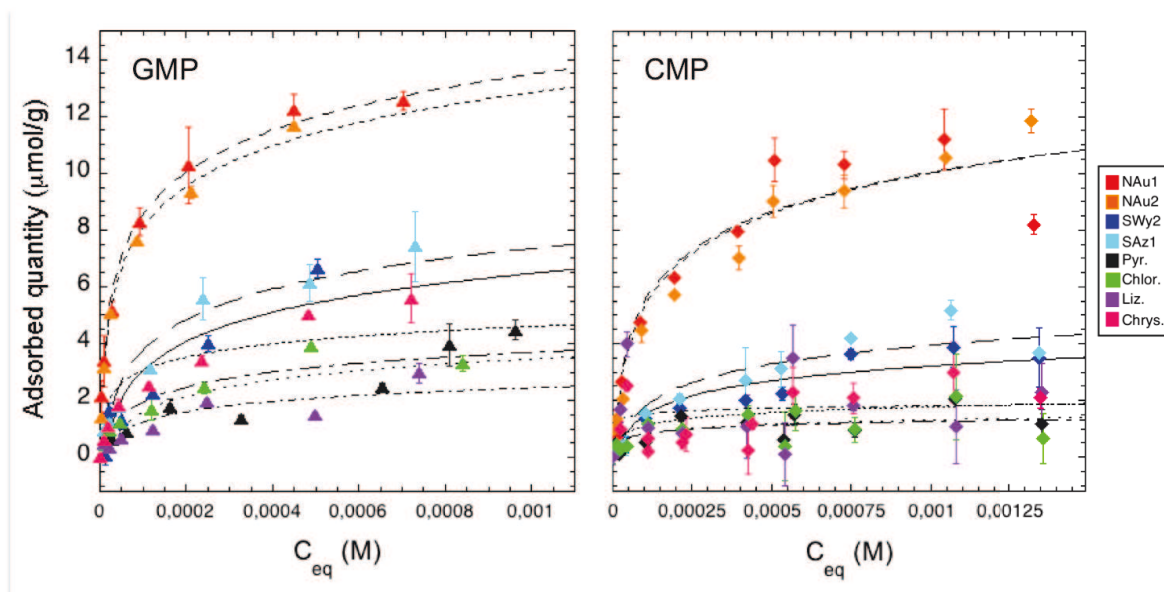


Figure III - 2 : Isothermes d'adsorption de GMP et CMP sur 8 phyllosilicates.

Les 8 minéraux étudiés présentent des affinités différentes pour un même nucléotide. Pour un même nucléotide, à C_{eq} égale l'ordre d'affinité pour les minéraux est lizardite < pyrophyllite < chlorite < chrysotile < montmorillonites < nontronites. Les argiles gonflantes adsorbent globalement plus de nucléotides que les argiles non gonflantes et que les serpentines. Les nontronites NAu1 et NAu2 adsorbent au moins deux fois plus de GMP et de CMP que les montmorillonites.

Les deux montmorillonites adsorbent des quantités similaires de nucléotides, à la fois GMP et CMP, malgré des CEC différentes de 113 et 89 meq/100g, respectivement. Le même comportement est observé pour les montmorillonites, SWy2 et SAz1, de CEC 89 et 128 meq/100g, respectivement.

II. Evolution de l'adsorption en fonction des paramètres environnementaux

II.1. Effet de la salinité

L'adsorption de GMP a été mesurée en fonction de la salinité entre 0 et 1 M (**Figure III -3**).

Nous n'observons pas de changements significatifs de l'adsorption de GMP en fonction de la salinité, excepté pour le chrysotile pour lequel l'adsorption augmente fortement lorsque la salinité diminue.

Nos résultats sont cohérents avec l'étude de Franchi et al. (Franchi, Ferris et al. 2003), où l'adsorption atteignait un plateau à la force ionique de 1 mM.

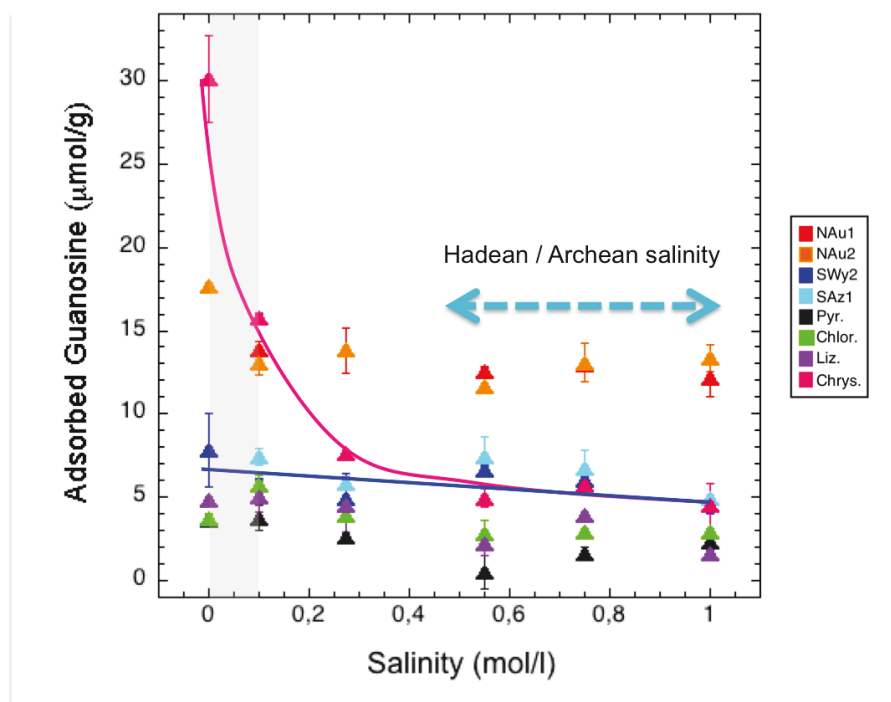


Figure III – 3 : Evolution de l'adsorption de GMP en fonction de la salinité. La flèche bleue indique la salinité supposée à l'Hadéen / Archéen. La partie grisée marque la zone d'étude de Franchi et al. (2003).

II.2.Effet du pH

Les effets des variations de pH sur l'adsorption des nucléotides ont été étudiés de 1 à 11 unités pH pour les 2 nucléotides GMP et dGMP (**Figure III – 4**).

Deux comportements distincts sont observés. Les argiles non gonflantes et les serpentines présentent des profils Adsorption vs pH similaires : l'adsorption évolue très peu en fonction du pH. En revanche, l'adsorption de GMP et dGMP augmente très fortement en dessous de pH 4 sur les argiles gonflantes, nontronite et montmorillonite. Cette hausse de l'adsorption à bas pH est plus de 4 fois supérieure pour les désoxyribonucléotides dGMP que pour les ribonucléotides GMP.

Dans le cas de Nau1, le pourcentage de nucléotides adsorbés est d'environ 5% à pH naturel, à la fois pour GMP et dGMP, mais atteint à pH 1 15% pour GMP et 80% pour dGMP. La

tendance est encore plus marquée pour SWy2, où la quasi totalité des nucléotides dGMP présents est adsorbée à pH 1.

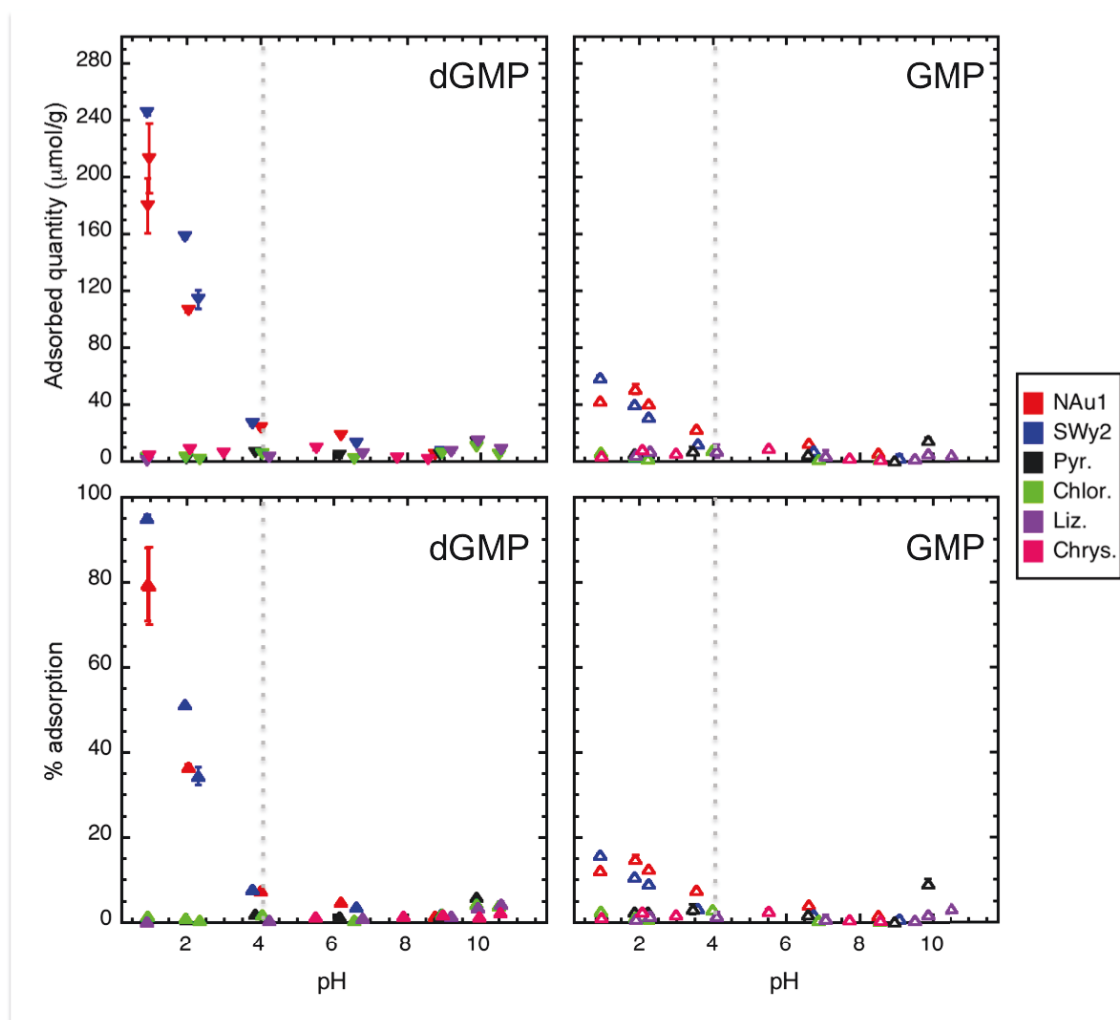


Figure III - 4 : Evolution de l'adsorption de dGMP et GMP en fonction du pH en $\mu\text{mol/g}$ (haut) et % adsorbé (bas).

Si on considère une superficie maximale de 100 \AA^2 par nucléotide (Miller 1961), une micromole couvrira au maximum $0,6 \text{ m}^2$. Nous avons calculé le recouvrement de la surface en fonction du pH (**Tableau III - 2**).

Tableau III – 2 : Recouvrement maximal en fonction du pH pour les argiles gonflantes NAu1 et SWy2 en pourcentage de la surface totale réelle en suspension.

Minéral	Nucléotide	Recouvrement (en % de la surface totale réelle)		
		pH 1	pH 2.2	pH 6.5
NAu1	GMP	10	10	3
	dGMP	45	26	4,5
SWy2	GMP	15	8	2
	dGMP	63	29	3

Les surfaces de NAu1 sont d'avantage couvertes à pH naturel (3% pour GMP, 4.5% pour dGMP) que les surfaces de montmorillonites (2% pour GMP, 3% pour dGMP). A pH 1, la nontronite adsorbe 80% des dGMP disponibles, ce qui recouvre au maximum 45% de sa surface. La montmorillonite adsorbe 95% des désoxyribonucléotides disponibles, recouvrant ainsi 63% de sa surface totale.

En conséquence, nous avons mesuré les isothermes d'adsorption de GMP à pH 2.3 pour 2 échantillons de montmorillonite SWy2 et de nontronite NAu1 (**Figure III – 5**).

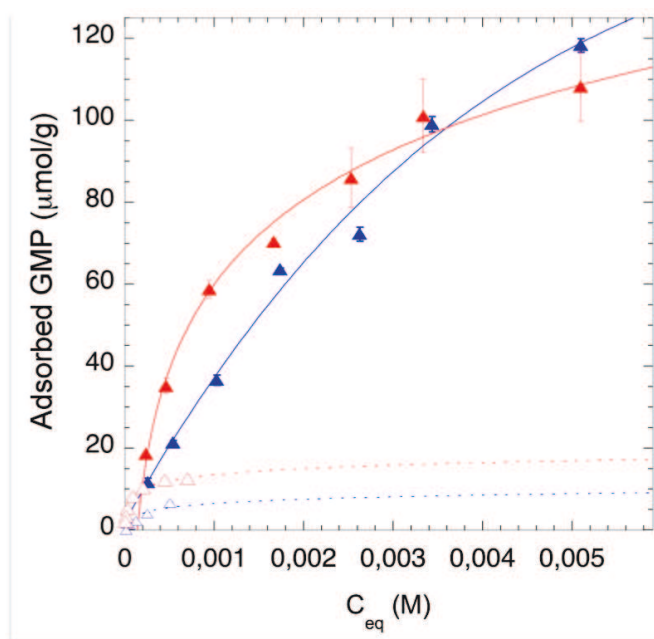


Figure III - 5 : Isothermes d'adsorption de GMP sur les surfaces de SWy2 (bleu) et NAu1 (rouge) à pH 2.3 (triangles pleins). Les isothermes d'adsorption de GMP sont également représentées pour comparaison (triangles vides).

Les 2 minéraux adsorbent entre 7 et 11 fois plus de nucléotides à pH 2 qu'à pH 6. Le plateau de saturation n'est pas atteint avant une concentration à l'équilibre de 6 mM.

II.3. Effet de la température

II.3.1. A pH 6,5

L'effet de la température sur l'adsorption de GMP et CMP a été étudié à pH naturel pour les 8 phyllosilicates (**Figure III – 6**).

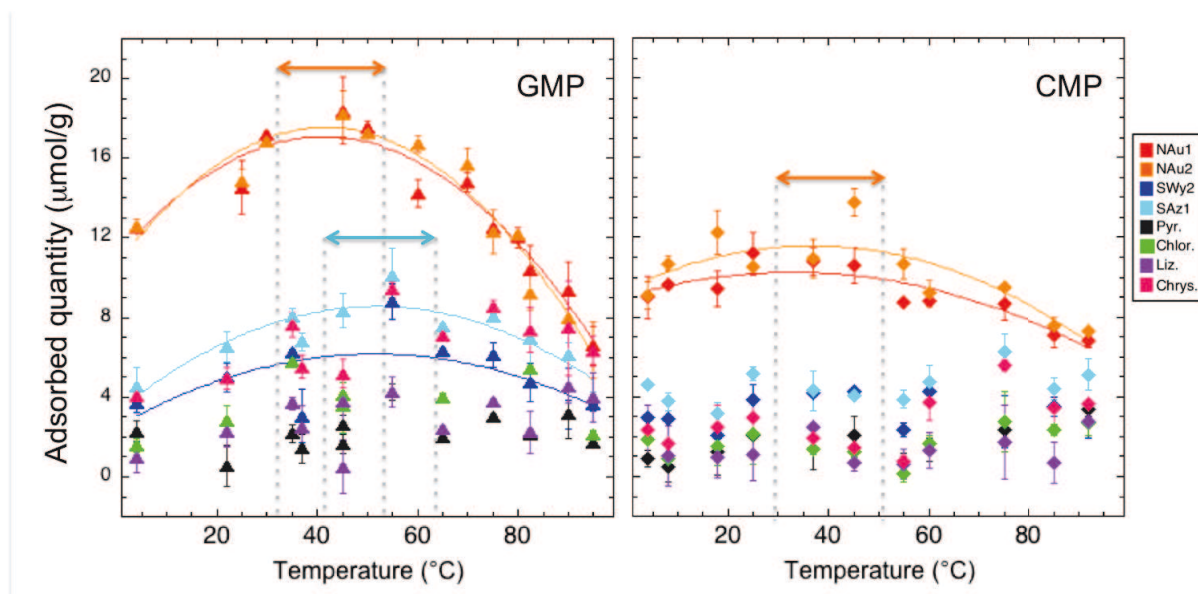


Figure III - 6 : Evolution de l'adsorption de GMP et CMP à pH naturel (= pH 6) en fonction de la température. Les flèches oranges et bleues marquent l'optimum d'adsorption sur les nontronites et sur les montmorillonites, respectivement.

Une température optimale d'adsorption est clairement observée pour l'adsorption de GMP entre 30-50 °C pour les nontronites, et entre 40-65° pour les montmorillonites. La même tendance est observée pour l'adsorption de CMP, sur les nontronites uniquement.

II.3.2. A pH acide

L'effet de la température sur l'adsorption de GMP et dGMP à pH 2,5 a été étudiée pour SWy2 et NAu1, qui sont en effet les 2 seuls minéraux qui présentent une évolution notable de l'adsorption en fonction du pH. Les résultats sont présentés en **Figure III – 7**.

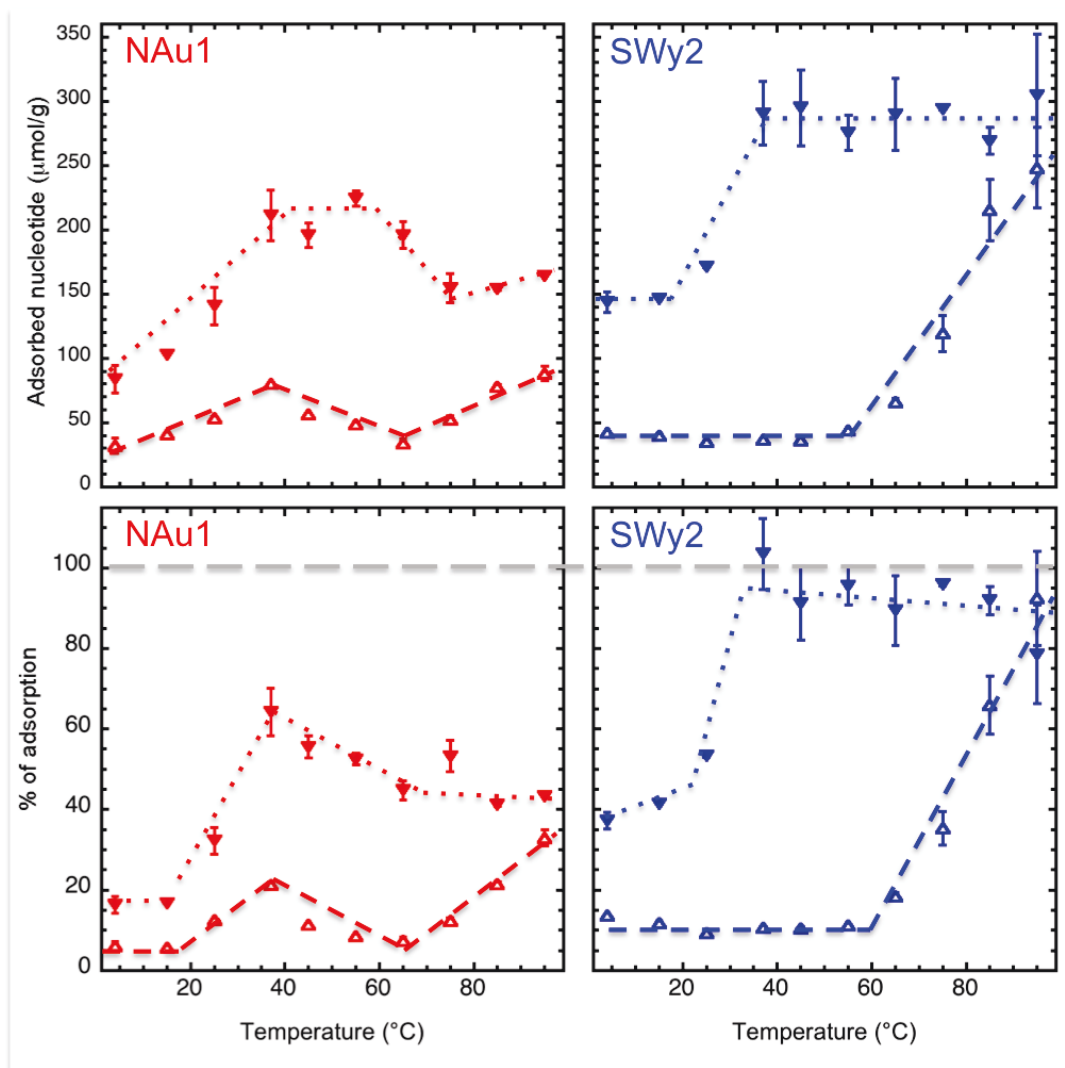


Figure III - 7 : Evolution de l'adsorption de GMP (triangles vides) et dGMP (triangles pleins) en fonction de la température à pH fixé à 2.5, en $\mu\text{mol/g}$ et en pourcentage de nucléotides adsorbés. Les lignes pointillées et tiretées servent de guides pour les yeux.

Sur les surfaces de nontronite NAu1, on observe une augmentation globale de l'adsorption de GMP et dGMP quand la température augmente ; dGMP s'adsorbe d'avantage que GMP à toute les températures considérées. Sur les surfaces de montmorillonite SWy2, on observe une hausse de l'adsorption de dGMP à partir de 20°, atteignant rapidement un plateau à 40°C. L'adsorption de GMP augmente également avec la température, mais à des températures plus élevées : à partir de 50°C, l'adsorption augmente progressivement pour rejoindre le plateau d'adsorption de dGMP aux alentours de 95°C.

Les pourcentages de nucléotides adsorbés atteignent 35% pour GMP et 45% pour dGMP en surface de NAl. La montmorillonite adsorbe quant à elle la totalité des dGMP disponibles dès 40°C, et autant de GMP à 95°C.

III. Résultats de spectroscopie Infrarouge

Nous avons analysé par spectroscopie IR des échantillons de nontronite, de montmorillonite et de pyrophyllite. Sur les montmorillonites et nontronites, nous n'observons pas de signal de nucléotides (données non présentées). Toutefois, sur la pyrophyllite nous observons un très net signal de molécules organiques, avec notamment des pics à 3409 et 3239 cm^{-1} , et un pic intense à 1632 cm^{-1} , qui pourraient correspondre respectivement au stretching des liaisons N-H, et à la vibration des groupes NH_2 (Kundu, Neumann et al. 2009) (**Figure III – 8**).

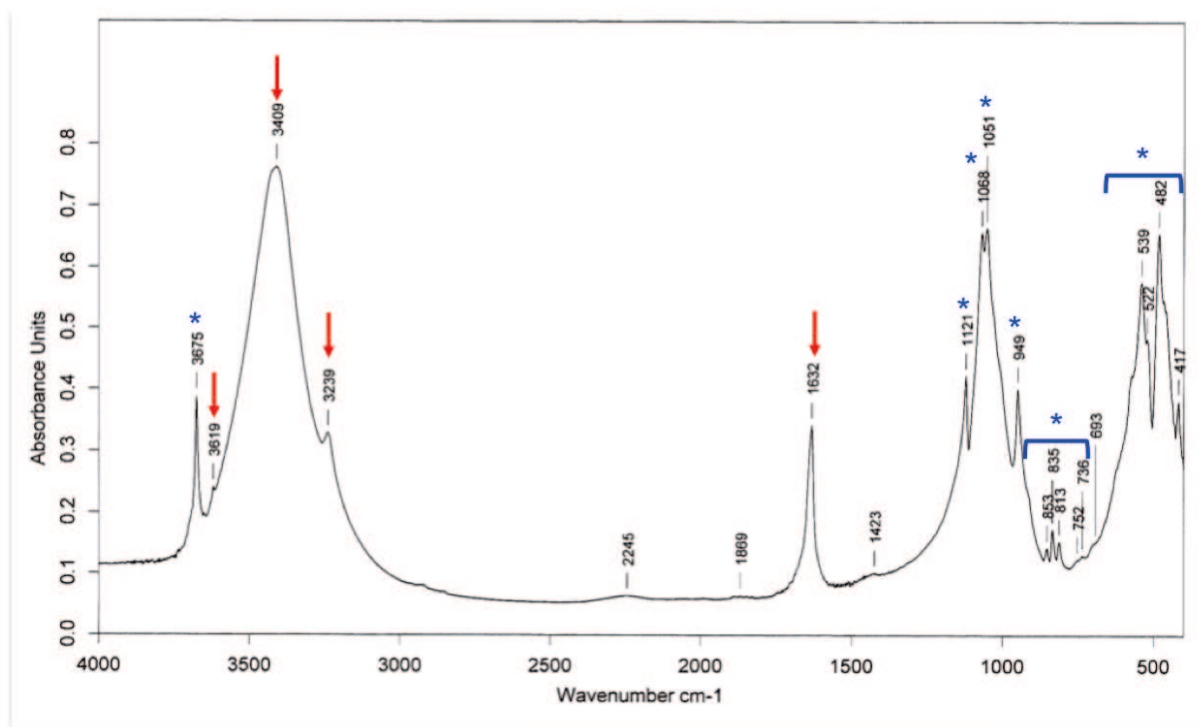


Figure III – 8 : Spectre IR d'un échantillon de pyrophyllite après adsorption d'AMP. Les pics caractéristiques de la pyrophyllite sont annotés d'une étoile bleue (Wang, Zhang et al. 2002). Les pics marqués d'une flèche rouge correspondent au signal des nucléotides.

Afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'adsorption, il sera nécessaire d'analyser également les nucléotides purs, ainsi que le minéral pur. L'adsorption entraîne en effet de légers décalages dans les fréquences des pics IR.

IV. Résultats de diffraction des rayons X (DRX)

Des mesures de DRX ont été réalisées sur des échantillons de nontronite NAu1 et de montmorillonite SWy2, à la fois à pH naturel et à pH 2, afin de vérifier l'hypothèse d'une intercalation des nucléotides dans l'espace interfoliaire des argiles. La **Figure III – 9** présente les diffractogrammes pour des échantillons de NAu1.

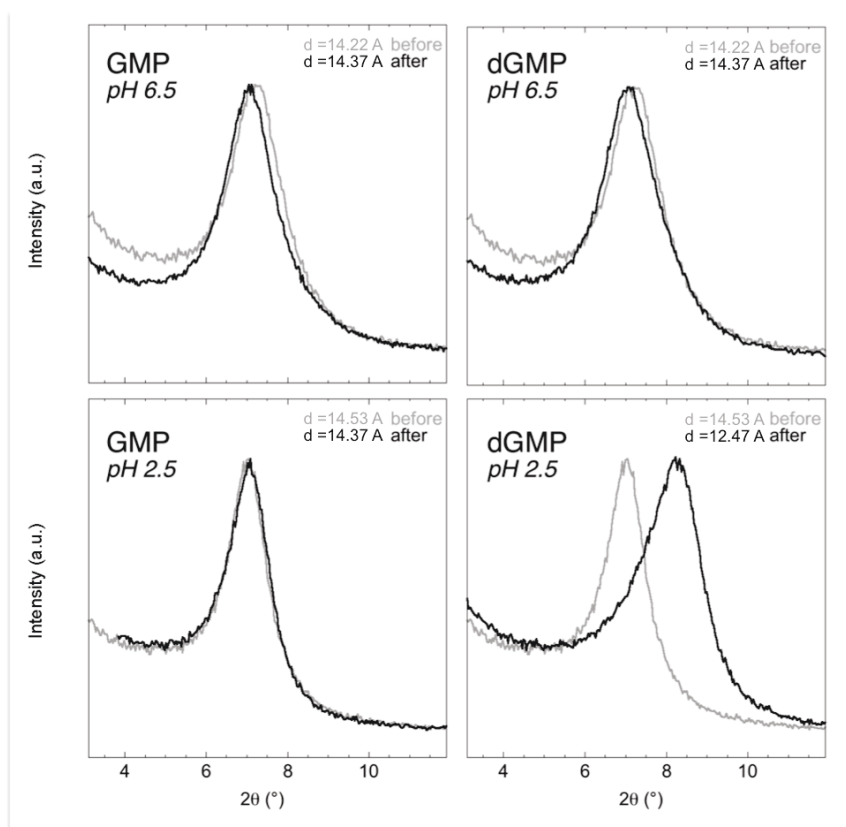


Figure III - 9 : Diffractogrammes de la nontronite NAu1 avant et après adsorption de GMP ou dGMP à pH naturel et à pH 2,5.

A pH naturel, on n'observe pas de différences significatives entre les d_{001} avant et après adsorption, ni pour les ribonucléotides ni pour les désoxyribonucléotides. Il n'y a donc pas d'intercalation de nucléotides dans l'espace interfoliaire.

A pH acide, on observe une nette contraction de l'espace interfoliaire de 14.53 à 12.47 Å (**Figure III – 9**). Là encore, une intercalation de nucléotides entre les feuillets semble peu probable.

Toutefois, compte tenu des quantités adsorbées, il est peu probable qu'un effet soit détecté en DRX. En effet, si on considère que la totalité des nucléotides adsorbés sont situés dans l'espace interfoliaire, cela ne représente au mieux 15% de la capacité d'échange cationique. Seulement 15% des particules seraient donc concernées par une intercalation en interfoliaire, et aucun effet ne pourrait être observé en DRX.

Conclusions

Nous avons montré que les nucléotides s'adsorbent de manière différentielle sur les surfaces. Les purines s'adsorbent globalement d'avantage que les pyrimidines, sauf sur le chrysotile où UMP est massivement adsorbé. Les désoxyribonucléotides s'adsorbent plus que leurs homologues ribonucléotides.

De plus, nous avons mis en évidence une très forte affinité des surfaces de nontronite pour les nucléotides. En moyenne, les nontronites adsorbent plus de 2 fois plus que les autres minéraux étudiés.

Du point de vue des conditions environnementales, la salinité n'a pas d'influence sur les quantités adsorbées, excepté pour le chrysotile, où l'on observe une hausse de l'adsorption à faible force ionique. Un optimum d'adsorption est observé entre 40 et 60°C. Pour les argiles non gonflantes et les serpentines, les variations du pH n'ont pas d'effet sur les quantités adsorbées. Pour les argiles gonflantes nontronites et montmorillonites, une forte augmentation

de l'adsorption est observée en dessous de pH 4. Un échange ionique pourrait expliquer cette hausse. Cependant, les résultats de diffraction des rayons X n'indiquent pas d'intercalation des nucléotides dans l'espace interfoliaire.

Enfin, lorsque l'on augmente la température à bas pH, les quantités adsorbées sur les argiles gonflantes, en particulier la montmorillonite, augmentent drastiquement. L'adsorption des désoxyribonucléotides augmente à plus faible température que l'adsorption des ribonucléotides. On atteint un plateau d'adsorption où la totalité des nucléotides présents est adsorbés par la montmorillonite.

Le chapitre suivant s'intéresse de plus près au mécanisme de l'adsorption.

Références bibliographiques

- Franchi, M., J. P. Ferris, et al. (2003). "Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **33**(1): 1-16.
- Kundu, J., O. Neumann, et al. (2009). "Adenine- and Adenosine Monophosphate (AMP)-Gold Binding Interactions Studied by Surface-Enhanced Raman and Infrared Spectroscopies." Journal of Physical Chemistry C **113**(32): 14390-14397.
- Miller, I. R. (1961). "The structure of DNA and RNA in the water-mercury interface." Journal of Molecular Biology **3**: 229-240.
- Wang, L., M. Zhang, et al. (2002). "Dehydroxylation and transformations of the 2 : 1 phyllosilicate pyrophyllite at elevated temperatures: An infrared spectroscopic study." Clays and Clay Minerals **50**(2): 272-283.

Chapitre 4

Mécanisme d'adsorption des nucléotides sur les surfaces minérales

I. Introduction

Les surfaces minérales ont un rôle déterminant dans l'origine des premiers biopolymères. Elles facilitent les synthèses prébiotiques (Saladino, Crestini et al. 2005), concentrent les monomères à partir d'un océan dilué (Cohn, Hansson et al. 2001; Hazen and Sverjensky 2010), catalysent leur polymérisation (Ferris 2005; Lambert 2008), et les protègent des dégradations (Lorenz and Wackernagel 1987; Romanowski, Lorenz et al. 1991; Cockell 1998; Scappini 2004). L'adsorption d'acides nucléiques sur les surfaces minérales est également importante en écologie et en évolution. De l'ADN persiste en effet dans les sols après relargage d'ADN par les cellules lysées, et est utilisé par les microorganismes pour des transferts de gènes, aussi appelés transfection (Gallori 1994; Trevors 1996).

Jusqu'à présent, les minéraux testés quant à l'adsorption des acides nucléiques incluent des oxydes de fer (Holm, Ertem et al. 1993; Cleaves, Jonsson et al. 2010) et de titane (Cleaves, Jonsson et al. 2010), la pyrite, l'olivine (Cleaves, Crapster-Pregont et al. 2011), les micas (Bezanilla, Manne et al. 1995), la calcite (Cleaves, Crapster-Pregont et al. 2011) ou le FeS (Hatton and Rickard 2008), mais les efforts ont surtout porté sur les phyllosilicates (Banin, Lawless et al. 1985; Ferris and Hagan 1986; Ferris, Ertem et al. 1989; Ferris 1999; Cai, Huang et al. 2006; Mignon, Ugliengo et al. 2009; Hashizume, van der Gaast et al. 2010). L'attention s'est focalisée sur les smectites, qui présentent de larges surfaces spécifiques et une grande réactivité vis à vis des molécules organiques, et plus particulièrement sur la montmorillonite (Banin, Lawless et al. 1985; Lawless, Banin et al. 1985; Ferris and Hagan

1986; Ferris, Ertem et al. 1989; Cai, Huang et al. 2006; Hashizume, van der Gaast et al. 2010), qui est le seul minéral à avoir été étudié en ce qui concerne la polymérisation.

Les minéraux testés ne reflètent toutefois pas la composition minéralogique des fonds océaniques Hadéens/Archéens. Des minéraux comme les serpentines ou des argiles riches en fer et en magnésium (chlorite, nontronite...) auraient été bien plus abondants, suite à l'altération aqueuse et hydrothermale de la croûte océanique mafique/ultra mafique (Hazen, Papineau et al. 2008; Meunier, Petit et al. 2010).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant au mécanisme d'adsorption. Les phyllosilicates présentent des sites amphotériques sur leurs faces latérales ; les smectites possèdent de plus des cations compensateurs de charge, et donc des sites d'échange ionique sur le plan basal. Des interactions ioniques ont été proposées entre les groupes phosphates chargés négativement et les sites amphotériques chargés positivement. De l'échange ionique est également suspecté à bas pH car les bases azotées acquièrent une charge positive (Cleaves, Jonsson et al. 2010). Le mécanisme d'adsorption n'est pas encore bien compris, contrairement à celui des acides aminés (Lambert 2008).

Ce chapitre a pour objectif d'interpréter les données d'adsorption acquises au cours de cette thèse en terme de mécanisme d'adsorption des nucléotides sur les surfaces des phyllosilicates. Nous avons sélectionné plusieurs phyllosilicates de structures et propriétés de surface variées, susceptibles d'être présents dans le contexte de l'origine de la Vie.

Nous nous concentrons dans un premier temps sur les smectites et comparons la montmorillonite avec la nontronite, une smectite riche en fer qui aurait été abondante à l'Hadéen/Archéen. Dans un second temps, nous étudions une gamme de phyllosilicates ferromagnésiens non gonflants, pyrophyllite, chlorite et serpentines. Les propriétés de surface de ces minéraux sont connues, et nous permettent donc de faire des hypothèses quant au mécanisme d'adsorption des nucléotides.

II. Adsorption de nucléotides sur des argiles gonflantes riches en Fe, Mg, Al

Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation, qui sera soumise au journal *Geochimica and Cosmochimica Acta*.

Résumé :

Les surfaces minérales auraient joué un rôle important dans la formation des premiers biopolymères, notamment en concentrant les monomères à partir d'un océan dilué dans le contexte de l'origine de la vie. Les phyllosilicates présentent de très grandes surfaces spécifiques, en particulier les argiles gonflantes, ou smectites, et sont par conséquent les minéraux les plus étudiés. Toutefois, les études sur l'adsorption et la polymérisation des acides nucléiques se concentrent sur la montmorillonite, une smectite qui n'aurait pas été abondante sur les fonds océaniques Hadéen/Archéen. Des phyllosilicates ferro-magnésiens comme la nontronite, résultant de l'altération aqueuse et hydrothermale de la croûte océanique mafique auraient été majoritaires. Dans cette étude, nous étudions l'adsorption de nucléotides sur deux smectites, la nontronite et la montmorillonite. Les propriétés de surface des particules d'argiles ont été mesurées dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'adsorption.

Adsorption of nucleotides onto Fe-Mg-Al rich swelling clays

Cécile Feuillie^{1*}, Isabelle Daniel¹, Laurent J. Michot², Ulysse Peidrera-Segade¹

¹ Laboratoire de Géologie de Lyon – Terre, Planètes, Environnement, CNRS - ENS de Lyon - Université Lyon 1, UMR 5276

² Laboratoire Environnement et Minéralurgie, CNRS Université de Lorraine, UMR 7569

Abstract

Mineral surfaces are thought to have played an important role in the origin of the first biopolymers, by among others concentrating the monomers from a dilute ocean. Phyllosilicates provide a high surface area for the concentration of prebiotic monomers, especially smectites or swelling clays, and have therefore been focused on. Though montmorillonite has been the most extensively studied mineral regarding adsorption and polymerization of nucleic acids, it might not have been abundant on the primitive ocean floor. Iron-magnesium rich phyllosilicates, such as nontronite, would have been much more abundant as a result of the aqueous and hydrothermal alteration of a mafic / ultramafic oceanic crust. Here we study the adsorption of nucleotides on two smectites, montmorillonite and nontronite. The surfaces of the clay particles were thoroughly characterised in order to unravel the mechanism of adsorption of nucleotides on phyllosilicates.

1. Introduction

The interactions between nucleic acids and mineral surfaces is of prime importance for at least two main reasons. Firstly, a significant amount of nucleic acids can be found in soils where it is used by microorganisms for gene exchange or transfection (Lorenz and Wackernagel 1987; Ogram, Mathot et al. 1994). Soil nucleic acids mainly originate from dead

1 organisms and after subsequent release in the environment, they are retained by mineral
2 surfaces where they are protected from degradation, whether enzymatic (Lorenz and
3 Wackernagel 1987; Romanowski, Lorenz et al. 1991), or UV mediated (Scappini 2004).
4 Secondly, the interaction between mineral surfaces and organics, especially nucleic acids,
5 may have played a crucial role in the origin of life. The hypothesis that mineral surfaces
6 mediated the prebiotic formation of genetic polymers was early proposed by Bernal in 1951
7 (Bernal 1951). Mineral surfaces would have played a double role, by first concentrating the
8 elementary bricks from a dilute ocean (Cohn, Hansson et al. 2001; Hazen and Sverjensky
9 2010) before catalyzing polymerization reaction of adsorbed surface species. In that context,
10 both adsorption (Trevors 1996; El Amri, Baron et al. 2004; Cleaves, Jonsson et al. 2010) and
11 polymerization (Ferris 2005) of nucleic acids on mineral surfaces have been extensively
12 studied. As far as adsorption is concerned, previous work mainly focused on the adsorption of
13 nucleic acids on metal oxides such as goethite (Holm, Ertem et al. 1993) and rutile (Cleaves,
14 Jonsson et al. 2010), as well as on olivine, calcite, pyrite (Cleaves, Crapster-Pregont et al.
15 2011), mica (Bezanilla, Manne et al. 1995) and clay minerals (Franchi, Bramanti et al. 1999;
16 Franchi, Ferris et al. 2003; Cai, Huang et al., 2006). As far as polymerization is concerned,
17 the polymerization of nucleotides catalyzed by mineral surfaces has mainly been investigated
18 using various types of montmorillonite clays as substrates (Ertem and Ferris, 1998; Ertem
19 and Ferris 2000; Ferris 2005; Huang and Ferris 2006; Aldersley, Joshi et al. 2009; Joshi,
20 Aldersley et al., 2009; Aldersley, Joshi et al., 2011; Joshi, Aldersley et al., 2011). A large
21 majority of studies have focused on montmorillonite (Banin, Lawless et al., 1985; Ferris and
22 Hagan 1986; Ferris, Ertem et al. 1989; Ertem and Ferris 1998; Franchi, Bramanti et al. 1999;
23 Ertem and Ferris 2000; Franchi, Ferris et al. 2003; Ferris 2005; Huang and Ferris 2006; Joshi
24 et al. 2009; Joshi, Aldersley et al., 2009; Aldersley, Joshi et al., 2011; Joshi, Aldersley et al.,
25 2011). Montmorillonite is a phyllosilicate belonging to the smectite family. These minerals

are layered materials with high aspect ratios (typically 50 to 1000) formed with two silicium tetrahedral sheets sandwiching one octahedral sheet. The layers bear a permanent negative charge resulting from isomorphic substitutions in either the octahedral or tetrahedral sheet that is compensated by exchangeable interlayer cations (Dixon 1989). In addition, the edges of the platelets bear broken-end hydroxyls sites, the protonation of which evolve as a function of pH (Thomas, Michot et al. 1999; Tombacz and Szekeres 2004; Zarzycki and Thomas 2006; Rozalen, Brady et al. 2009). Due to this particular structure and to their small size, smectite minerals are among the most reactive minerals in sub-surface environments and they are for instance known to form numerous complexes with organic molecules in soils (Sheng, Johnston et al. 2001; Wattel-Koekkoek, van Genuchten et al. 2001). In present environments, montmorillonite is the most commonly encountered member of this family. In contrast, conditions prevailing on the floor of the Hadean/Archean ocean (Russell and Hall 1997) where life could have originated do not favor montmorillonite formation. Hydrothermal and aqueous alteration of basaltic/komatiitic lava rather produces Fe-Mg rich clays such as nontronite (Hazen, Papineau et al. 2008; Meunier, Petit et al. 2010). In the context of the origin of life, it then appears relevant to analyze the interactions of nucleic acids with nontronite, especially considering that the presence of structural iron could play a role in catalytic reactions. The present contribution aims at studying in details the adsorption of five different nucleotide on two nontronite samples and two montmorillonites to see whether the mineralogy of the smectite influences the adsorption behavior of these organic moieties. Adsorption experiments were carried out under high ionic strength conditions close to the conditions encountered in marine environments. As the pH of the Hadean/Archean ocean could have been strongly different from that of present oceans, the influence of pH on adsorption features was also analyzed as well.

2. Material and methods

2.1. Nucleotides

Disodium salts of monophosphated mononucleotides were purchased from Sigma Aldrich™. Four 5'-monophosphate ribonucleotides, Adenosine, Cytidine, Uracil and Guanosine were investigated, as well as a deoxyribonucleotide, 5'-monophosphate guanosine. In the following they will be referred to as AMP, CMP, UMP, GMP and dGMP, respectively. The 2D-structure of the nucleotides are presented in Figure 1 whilst their solubility and pKa values are listed in Table 1.

2.2. Studied minerals

Two Montmorillonite samples, SWy2 from Wyoming and SAz1 from Arizona, were studied as a reference to previous work on the adsorption of nucleic acids on clay minerals. In addition, two nontronite samples from Australia, NAu1 and NAu2, were also investigated. All samples were purchased from the Source Clays Minerals Repository of the Clay Mineral Society (Purdue University, USA). Prior to use, these four natural clay samples were purified from accessory minerals such as quartz, feldspar and oxyhydroxides and sodium-exchanged. A size fractionation procedure was then applied by successive centrifugations. Details about the preparation can be found elsewhere (Michot, Bihannic et al. 2004). The average particle dimensions were determined by transmission electron microscopy (Michot, Bihannic et al. 2008; Paineau, Bihannic et al. 2011). Their cationic exchange capacities (CEC) were determined by exchanging the cations with the cobaltihexamine ion $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (Orsini 1976). The provenance, structural formula and Cation Exchange Capacities (CEC) of the studied clays are listed in Table 2 whereas the average particle dimensions are reported in Table 3. The clays were initially suspended in water at concentrations of 11.6 g/l, 30 g/l, 10 g/l and 13.7 g/l for SWy2, SAz1, NAu1 and NAu2, respectively. The suspensions were dried overnight, and the obtained residue was powdered for further use in adsorption experiments.

2.3. Mineral surface characterization

2.3.1. X-ray diffraction (XRD)

X-Ray Diffractograms were obtained on a D8 Advance Bruker diffractometer with Co K α 1 radiation ($\lambda = 1.7902 \text{ \AA}$). Reference diffractograms were recorded on non-oriented samples. XRD measurements were also performed on nontronite samples before and after nucleotide adsorption. Due to the small amount of clay material used in each experiment (1.5 - 4 mg), the latter patterns were recorded on silicium carriers, and the samples were therefore oriented.

2.3.2. Zeta potential (electrophoretic mobility)

The Zeta potential indicates the global charge of the particles, and is calculated from the electrophoretic mobility. The electrophoretic mobility of smectite samples and its evolution as a function of pH and ionic strength was measured using a Zetaphoremeter IV from CAD instrumentation™. Mineral particles were suspended at concentrations < 1000 ppm in NaCl or NaNO₃ solutions with ionic strength ranging between 10⁻⁵ M and 10⁻² M. Suspensions were sonicated prior to measurements to ensure proper dispersion, and pH was adjusted with HCl or NaOH. A laser beam illuminates the particles in the stationary layer. The mobility of the particles is then measured from video analysis as the electrophoretic cell is submitted to an electric field. The potential in the shearing plane, called Zeta potential, is then obtained using Smoluchowski equation (Van Olphen 1977).

2.4. Adsorption protocol

Nucleotides were dissolved in a simple aqueous salt solution analog to modern seawater containing 0.5 M NaCl and 0.05 M MgCl₂. Adsorption experiments were carried out in 2ml Eppendorf safe-lock tubes by mixing 2–4 mg of a mineral sample with 1 ml of a solution of mononucleotide with concentrations from 0 to 400 mg/ml. The suspension was vortexed for 10 seconds to ensure good homogenization, and then allowed to stand for 24 hours in the dark

at room temperature. Such a time was chosen to ensure equilibrium. The suspensions at a natural pH around 6.5 were then centrifuged during 25 minutes at 16100 g. The decanted minerals were dried and stored for further experiments, whereas the supernatants were analyzed by UV spectrophotometry using a Nanodrop® N-D- 1000 spectrophotometer. The concentration in nucleotides was then deduced from the absorbance at 260 nm. The adsorbed amount of nucleotides was calculated from the difference in concentration before and after adsorption.

To analyze the effect of pH on the adsorption of nucleotides, adsorption isotherms were performed at fixed pH values adjusted using Hcl or NaOH between 1 and 10.

3. Results

3.1. Surface properties of the mineral samples

3.1.1 Zeta potential

The pH evolution of the zeta potential of SWy2 Montmorillonite and Nau1 Nontronite is shown in Figure 2. At a given ionic strength SWy2 and NAu1 display a quasi-constant zeta potential across the investigated pH range 2-11 (Figure 1). The zeta potential of both clays is negative along the whole pH range and no isoelectric point (IEP) is reached. Also, for each mineral the pH – zeta potential curves for different ionic strengths are superimposed. Such behavior has been previously reported for smectites that bear a permanent negative charge (Thomas, Michot et al. 1999; Lagaly and Ziesmer 2003; Lagaly 2006). The observed pH independence shows that the global charge of the mineral particles is mainly due to the structural charge (Thomas, Michot et al. 1999; Tombacz and Szekeres 2004) with little influence of the amphoteric edge sites Al-OH, Mg-OH, Fe-OH or Si-OH.

3.2. Adsorption isotherms

Figure 3 displays the adsorption isotherms of four ribonucleotides, adenosine AMP, guanosine GMP, cytidine CMP and uracil UMP, and one deoxyribonucleotide, guanosine dGMP on Nau1 nontronite (Figure 3a) and Swy2 montmorillonite (Figure 3b) at natural pH. This reveals a clear difference as nontronite adsorbs on average twice as much nucleotides than montmorillonite. In addition, it appears that the amount of adsorbed nucleotide change with their nature for both smectite samples. On nontronite, for a given equilibrium concentration, $CMP < UMP < GMP < dGMP < AMP$ (Figure 3, a). The order thus obtained is close to that observed for montmorillonite, *i.e.* $CMP \approx UMP < GMP \approx AMP < dGMP$ (Figure 3, b). Interestingly, deoxyribonucleotide dGMP systematically display a higher adsorbed amount than its corresponding ribonucleotide GMP. Such results are consistent with previous work on rutile surfaces by Cleaves et al. (2010).

To further assess the possible differences between nontronite and montmorillonite, adsorption isotherms for GMP and CMP were carried out for the four studied minerals SWy2, SAz1, NAu1 and NAu2 (Figure 4). The adsorption isotherms for nontronites NAu1 and NAu2 are almost superimposed for both nucleotides, which suggests that in the conditions used in the present study, *i.e.* high salinity and natural pH, differences in the amount of structural charge (Table 2) do not influence the adsorption behavior of nucleotides. The same statement applies to montmorillonites as SAz1 and Swy2 montmorillonites adsorb both GMP and CMP in a similar way although presenting significantly different CEC values (Table 2). In contrast, the difference between nontronite and montmorillonite appears to be real and reproducible.

3.3 pH adsorption profiles

Figure 5 presents the evolution with pH of the adsorbed amount of GMP and dGMP amount on both NAu1 nontronite and Swy2 montmorillonite for an initial concentration in nucleotide of 1 mM. The results are plotted either as adsorbed amounts (Figures 5a and 5b) or as % adsorbed (Figure 5c and 5d). Adsorption of nucleotides on both minerals display a significant

pH dependence with an increase in adsorption with decreasing pH in agreement with previous studies (Banin, Lawless et al. 1985; Benetoli, de Santana et al. 2008). Such increase is particularly striking for pH values below 4 and is more marked for deoxyribonucleotide dGMP compared to ribonucleotide GMP. Indeed, in the case of Nau1 nontronite, the percentage adsorbed for both molecules is around 5% at natural pH and reaches 15% for GMP and up to 80% for dGMP at pH1. The trend is even higher for montmorillonite where the adsorption percentage goes up to 95 % at pH 1.

3.4. X-ray diffraction results

In the case of swelling clay minerals, X-ray diffraction can provide information on the possible intercalation of molecules in the interlayer space. Figure 6 then presents the diffractograms obtained before and after adsorption of GMP and dGMP in the case of Nau1 nontronite, both at natural pH 6.5 and at pH 2.5.

At pH 6.5 (Figure 6 A), the adsorption of either GMP or dGMP does not lead to any significant evolution of the diffractograms, whereas at pH 2 (Figure 6B) adsorption is accompanied by a slight decrease of the apparent $d(001)$ from 14.53 Å before adsorption to 12.47 Å after adsorption. In all cases, and in agreement with previous work (Franchi, Bramanti et al. 1999; Franchi, Ferris et al. 2003), it appears that nucleotide intercalation in the interlayer is not dominant in the adsorption conditions used in the present study. Similar results are observed for SWy2 samples (data not shown).

3. Discussion

3.1. Comparison between the different nucleotides

As shown on Figure 3, for a given adsorbent, the adsorbed amounts of the various nucleotides are significantly different. It is tempting to define an affinity order on the basis of these results. However, the observed differential adsorption at natural pH for the five studied nucleotides might also simply reflect differences in aqueous solubility as was proposed by

Hashizume in his study on the adsorption of nitrogenous bases on Mg-exchanged montmorillonite (Hashizume, van der Gaast et al. 2010). To investigate this point further, we applied a method developed for surfactants by Cases et al. (1992). To compare the mechanism of adsorption of several homologous molecules, the adsorption data are normalized to a reference phase. If the adsorbates have the same behavior on the surface, the isotherms will superimpose. Here, we take as a reference an aqueous solution of nucleotides at saturation; the concentration of nucleotides is therefore their solubility. The adsorbed amounts are then plotted against the ratio (C_{eq}/C_{sol}), where C_{eq} is the equilibrium concentration of nucleotides in the supernatant after adsorption and C_{sol} is the equilibrium concentration of nucleotides in the reference phase *i.e.* the nucleotide's respective solubility. The solubility values used in this study were calculated from the Virtual Computational Chemistry Laboratory ALOGPS (Tetko 2005; Tetko, Gasteiger et al. 2005) and are listed in Table 1. Results for adsorption data acquired at pH 6.5 and room temperature, are presented in Figure 7. For both SWy2 and NAu1, the adsorption isotherms of AMP, CMP, GMP, UMP and dGMP superimpose almost perfectly, which indicates that the five nucleotides have similar adsorption mechanism at pH 6.5. As a consequence, it is possible to analyze the adsorption mechanisms by concentrating on one or two nucleotides only.

4.2 Adsorption at neutral pH. Comparison between clay samples.

As shown in all the previously reported experiments nontronites appear to adsorb nucleotides to a higher extent compared to montmorillonites. In order to compare adsorption results obtained on various mineral surfaces, it is important to normalize the results by taking into account the surface area accessible to the adsorbate molecules. Unfortunately, in the case of swelling clay minerals, defining the exact surface area that must be considered for interpreting adsorption at the solid/liquid interface is far from being an easy task. Indeed, classical measurements by gas adsorption performed on dry powdered samples, are not fully

representative of the true surface area available during an adsorption experiment in suspension. Recent small angle X-ray Scattering (SAXS) experiments (Michot, Bihannic et al. 2006; Paineau, Bihannic et al. 2011) have shown that for the clay minerals used in the present work, and for ionic strength $\leq 10^{-3}$ M/L, individual clay platelets are present in suspensions. In such a case, the surface area to be considered is simply provided by the dimensions and density of the particles (Table 3), montmorillonite being assimilated to disks whereas nontronite particles present a lath shape. This will however not be the case in the present work where the high ionic strength used (0.5 M NaCl, 0.05 M MgCl₂) is well above the critical coagulation concentration between 3 and 20 mM for NaCl (Lagaly 2006). Coagulation will lead to a decrease of the total number of particles in suspension (Thomas, Michot et al. 1999), and the effective surface area available for adsorption consequently decreases. As far as coagulation is concerned, three types of arrangements have been proposed to occur: edge-edge, edge-face or face-face aggregation. The edge-face configuration is supposed to be favored at low pH (Lagaly and Ziesmer 2003; Tombacz and Szekeres 2004; Lagaly 2006; Michot et al., in prep), but does not correspond to a global free energy minimum (Meyer, Levitz et al. 2001; Jonsson, Labbez et al. 2008). Higher pH and higher ionic strength favor the face-face configuration, and in conditions close to those used in our adsorption experiments, SAXS and Transmission X-ray microscopy experiments have revealed dominant face-face configurations (Michot et al., in prep) with the appearance of a correlation peak between platelets. Using Scherrer's formula, it is possible in such a configuration to determine the average number of platelets per stack/particle, which in turn provides an estimate of the total surface area. As the average size of the stacks in those ionic strength conditions corresponds to four layers (Michot et al., in prep) the total surface area available for adsorption can be estimated as the total surface area deduced from the particles dimensions (Table 3) divided by a factor of 4.

Figure 8 presents the adsorption isotherms for both GMP (Figure 8A) and CMP (Figure 8B) on the four studied swelling clay minerals normalized by the total surface area. Two facts can be deduced from these figures: (i) nontronites adsorb more nucleotides than montmorillonite per m² of total surface area. (ii) The adsorbed amount remains very low. Indeed, assuming an average cross-sectional area of 100 Å for nucleotides (Miller 1961), the surface coverage corresponding to the highest adsorbed amount would be equal to 0.03 and 0.02, for nontronites and montmorillonites, respectively.

However, considering (i) the shape of the isotherms, (ii) the XRD results that show no intercalation, (iii) the crystal chemistry of swelling clays and (iv) the physico-chemical properties of the nucleotides, it could be likely that these molecules interact mainly with the edge surfaces of clay minerals. In the conditions of our experiments, as already mentioned, face-face coagulation is the dominant mechanism, which should therefore not affect the accessible edge surface area. Consequently, the edge surface area to consider are directly derived from the morphological information reported in Table 3. Figure 9 presents the normalization of the isotherms by the edge surface area. There again, nontronites adsorb more nucleotides than montmorillonites, but the surface coverage corresponding to the highest adsorbed amounts account for around 0.70 and 0.60, for nontronite and montmorillonite, respectively. As the shape of the adsorption isotherms shows that the highest values do not correspond to a saturation of adsorbed amount, it can be reasonably assumed that nucleotide adsorption would lead to the completion of a monolayer on the edge surfaces. Such findings agree with previous results.

Indeed, Cleaves et al. (2010) showed that the adsorption of nucleotides on rutile surfaces is ten fold more favorable than that of nitrogenous bases and nucleosides, thus revealing the crucial role played by phosphate groups. Similar trends were reported by Hashizume et al. (2010) in their study of the adsorption of RNA components, nitrogenous bases, ribose and

phosphate on Mg- exchanged montmorillonite. At neutral pH, the interaction between nucleotides and clay minerals then appears to be mainly controlled by phosphate groups that can interact with edge sites by ligand exchange with the "oxide like" sites Al-OH, Fe-OH and Si-OH thus forming inner-sphere complexes with hydroxyl groups (Borggaard, Jorgensen et al. 1990; Gimsing and Borggaard 2002; Kasama, Watanabe et al. 2004; Zeng, Li et al. 2004). In that context the difference between nontronite and montmorillonite can be tentatively assigned to the higher affinity of phosphate for Fe-OH groups compared to Al-OH groups (Lake, Coolidge et al. 2007). Such assignment is confirmed by the shift towards lower concentration, *i.e.* higher adsorption energy observed between nontronites and montmorillonites in Figure 9. It must be pointed out that numerical simulations recently carried out to analyze the adsorption of nucleic acids on montmorillonite (Swadling, Coveney et al. 2010) suggest that, at neutral pH, adsorption could be due to cation mediation between the negative clay basal plane and the uncharged nitrogenous bases through Lennard-Jones interaction. However, in view of the high ionic strength used in our experiment, such a mechanism should only play a minor role.

4.3 Influence of pH.

As illustrated by Figure 5, pH has a strong influence on the adsorption of nucleotides on swelling clay minerals. The adsorbed amount is negligible for pH values ≥ 8 , increases slowly for decreasing down to pH 4 whereas lower pH result in a drastic raise in adsorption. Such changes can be interpreted by considering the combined evolution of nucleotides and mineral surface speciation with pH. As far as nucleotides GMP and dGMP are concerned, the evolution of their chemistry with pH is similar. Above pH 6.3-6.4, the phosphate group carries 2 negative charges and the base is uncharged. Between pH 6.3 and pH 2.4, the nucleotide has only one negative charge on the phosphate group. Below pH 2.4 the nitrogenous gains a positive charge on the N7, and still carries a negative charge on the

phosphate group. As shown by zeta potential experiments, mineral surfaces are globally negatively charged along the whole pH range (Figure 2). However, as already mentioned, this global charge mainly results from structural charge that does not change with pH whereas edge sites evolve with pH. Rozalen et al. (2009) have shown that the proportion of AlOH_2^+ sites increases below pH 8 reaching a plateau at pH 4. Some studies have tried to determine the isoelectric point (IEP) of the edge sites. However, no consensus has been reached yet. For Tombacz et al. (2004) the edges are positively charged below pH 6.5, for Thomas et al. (1999) the IEP of the edges is 3.6, for Lagaly (2006) it would be somewhat above pH 5. In any case the proportion of positively charged edge sites increases at low pH which could favor ionic interactions with the negatively charged phosphate group, which would explain the evolution of adsorption with pH for $4 \leq \text{pH} \leq 8$.

The situation changes again below pH 2.4. Indeed, at this pH, both GMP and dGMP protonate on the N7 of the guanosine and therefore carry a positive charge on the nitrogenous base added to the negative charge on the phosphate group (Table 1, pKa values). In such conditions, ionic exchange could be favored and cationic nucleotide species could compete with Na^+ and Mg^{2+} for the cation exchange sites on the basal planes. This should result in partial intercalation of nucleotides in the interlayer, which appears at first sight to be ruled out by XRD measurements carried out after adsorption at pH 2 (Figure 6). However, considering the amount adsorbed, assuming that all adsorbed GMP or dGMP were located in the interlayer space, this would represent at most 15 % of the cationic exchange capacity of the clay, a quantity that is barely enough for observing any effect by XRD.

Conclusion

We have studied the adsorption of four ribonucleotides and one deoxyribonucleotide on montmorillonite and nontronite to better understand the adsorption mechanism. XRD results ruled out the intercalation of the nucleotides in the interlayer, at natural and low pH. The

adsorption of nucleotides would mostly happen on the edge surface of the clay platelets by ligand exchange between the phosphate groups and the –OH groups from the edge sites. Some interaction can also happen between the planar nitrogenous base and the negatively charged basal plane by cation mediation. On each mineral, the apparent difference between the nucleotides reflects solubility disparity, and we have shown that all five nucleotides studied adsorb through a similar mechanism. At lower pH some ionic exchange could occur as the nucleotide gain a positive charge.

Nontronite has proven to adsorb more nucleotides than montmorillonite. Furthermore its relevance to the origin of life geological context is higher than montmorillonites. Investigating a larger range of minerals relevant to this context would be meaningful. Moreover if adsorption happens mostly on the edge surface, swelling clays might not be the most appropriate research model. Serpentine minerals, chlorite, or other non-swelling clays would have been similarly or even more abundant than nontronite and would present a larger proportion of edge surfaces.

Also, the adsorption mechanism of nucleotides on mineral surfaces has to be further investigated. Indeed, montmorillonite surfaces have been proven to catalyse the polymerization of nucleic acids (Ferris 2005), but an adsorption of nucleotides through phosphate groups on the surface might be a problem to obtain the correct phosphodiester linkage.

References

- Aldersley, M. F., P. Joshi, et al. (2009). "RNA Synthesis by Mineral Catalysis." *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **39**(3-4): 200-200.
- Aldersley, M. F., P. C. Joshi, et al. (2011). "The role of montmorillonite in its catalysis of RNA synthesis." *Applied Clay Science* **54**(1): 1-14.
- Banin, A., J. G. Lawless, et al. (1985). "Ph Profile of the Adsorption of Nucleotides onto Montmorillonite .2. Adsorption and Desorption of 5'-Amp in Iron-Calcium Montmorillonite Systems." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **15**(2): 89-101.
- Benetoli, L. O. D., H. de Santana, et al. (2008). "Adsorption of nucleic acid bases on clays: an investigation using Langmuir and Freundlich isotherms and FT-IR spectroscopy." *Monatshefte Fur Chemie* **139**(7): 753-761.
- Bernal, J. D. (1951). *The physical basis of life*.
- Bezanilla, M., S. Manne, et al. (1995). "Adsorption of DNA to Mica, Silylated Mica, and Minerals - Characterization by Atomic-Force Microscopy." *Langmuir* **11**(2): 655-659.
- Borggaard, O. K., S. S. Jorgensen, et al. (1990). "Influence of Organic-Matter on Phosphate Adsorption by Aluminum and Iron-Oxides in Sandy Soils." *Journal of Soil Science* **41**(3): 443-449.
- Cai, P., Q. Huang, et al. (2006). "Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol." *Soil Biology & Biochemistry* **38**(3): 471-476.
- Cases, J. M. and F. Villieras (1992). "Thermodynamic Model of Ionic and Nonionic Surfactant Adsorption Abstraction on Heterogeneous Surfaces." *Langmuir* **8**(5): 1251-1264.
- Cleaves, H. J., E. Crapster-Pregont, et al. (2011). "The adsorption of short single-stranded DNA oligomers to mineral surfaces." *Chemosphere* **83**(11): 1560-1567.
- Cleaves, H. J., C. M. Jonsson, et al. (2010). "Adsorption of Nucleic Acid Components on Rutile (TiO₂) Surfaces." *Astrobiology* **10**(3): 311-323.
- Cohn, C. A., T. K. Hansson, et al. (2001). "Fate of prebiotic adenine." *Astrobiology* **1**(4): 477-480.
- Danyluk, S. S., Hruska, F.E. (1968). "The effect of pH upon the nuclear magnetic resonance spectra of nucleosides and nucleotides." *Biochemistry* **7**(3).
- Dixon, J. B., Weed, S.B. (1989). *Minerals in Soil Environments*. Madison, WI, USA.
- El Amri, C., M. H. Baron, et al. (2004). "Adenine adsorption on and release from meteorite specimens assessed by surface-enhanced Raman spectroscopy." *Journal of Raman Spectroscopy* **35**(2): 170-177.
- Ertem, G. and J. P. Ferris (1998). "Formation of RNA oligomers on montmorillonite: site of catalysis." *Orig Life Evol Biosph* **28**(4-6): 485-499.
- Ertem, G. and J. P. Ferris (2000). "Sequence- and regio-selectivity in the montmorillonite-catalyzed synthesis of RNA." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **30**(5): 411-422.
- Ferris, J. P. (2005). "Mineral catalysis and prebiotic synthesis: Montmorillonite-catalyzed formation of RNA." *Elements* **1**(3): 145-149.
- Ferris, J. P., G. Ertem, et al. (1989). "The Adsorption of Nucleotides and Polynucleotides on Montmorillonite Clay." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **19**(2): 153-164.
- Ferris, J. P. and W. J. Hagan (1986). "The Adsorption and Reaction of Adenine-Nucleotides on Montmorillonite." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **17**(1): 69-84.

- 1 Franchi, M., E. Bramanti, et al. (1999). "Clay-nucleic acid complexes: Characteristics and
2 Implications for the preservation of genetic material in primeval habitats." Origins of
3 Life and Evolution of Biospheres **29**(3): 297-315.
- 4 Franchi, M., J. P. Ferris, et al. (2003). "Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids
5 on clay surfaces in prebiotic environments." Origins of Life and Evolution of the
6 Biosphere **33**(1): 1-16.
- 7 Franchi, M., J. P. Ferris, et al. (2003). "Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids
8 on clay surfaces in prebiotic environments." Orig Life Evol Biosph **33**(1): 1-16.
- 9 Gates, W. P., P. G. Slade, et al. (2002). "Site occupancies by iron in nontronites." Clays and
10 Clay Minerals **50**(2): 223-239.
- 11 Gimsing, A. L. and O. K. Borggaard (2002). "Competitive adsorption and desorption of
12 glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides." Clay Minerals **37**(3): 509-515.
- 13 Grybos, M., L. J. Michot, et al. (2010). "Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles:
14 Evidence for basal surface reactivity of nontronite." Journal of Colloid and Interface
15 Science **343**(2): 433-438.
- 16 Hashizume, H., S. van der Gaast, et al. (2010). "Adsorption of adenine, cytosine, uracil,
17 ribose, and phosphate by Mg-exchanged montmorillonite." Clay Minerals **45**(4): 469-
18 475.
- 19 Hazen, R. M., D. Papineau, et al. (2008). "Mineral evolution." American Mineralogist **93**(11-
20 12): 1693-1720.
- 21 Hazen, R. M. and D. A. Sverjensky (2010). "Mineral Surfaces, Geochemical Complexities,
22 and the Origins of Life." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **2**(5).
- 23 Holm, N. G., G. Ertem, et al. (1993). "The Binding and Reactions of Nucleotides and
24 Polynucleotides on Iron-Oxide Hydroxide Polymorphs." Origins of Life and Evolution
25 of the Biosphere **23**(3): 195-215.
- 26 Huang, W. H. and J. P. Ferris (2006). "One-step, regioselective synthesis of up to 50-mers of
27 RNA oligomers by montmorillonite catalysis." Journal of the American Chemical
28 Society **128**(27): 8914-8919.
- 29 Jonsson, B., C. Labbez, et al. (2008). "Interaction of Nanometric Clay Platelets." Langmuir
30 **24**(20): 11406-11413.
- 31 Joshi, P. C., M. F. Aldersley, et al. (2009). "Mechanism of Montmorillonite Catalysis in the
32 Formation of RNA Oligomers." Journal of the American Chemical Society **131**(37):
33 13369-13374.
- 34 Joshi, P. C., M. F. Aldersley, et al. (2011). "Homochiral Selectivity in RNA Synthesis:
35 Montmorillonite-catalyzed Quaternary Reactions of D, L-Purine with D, L-
36 Pyrimidine Nucleotides." Origins of Life and Evolution of Biospheres **41**(3): 213-236.
- 37 Kasama, T., Y. Watanabe, et al. (2004). "Sorption of phosphates on Al-pillared smectites and
38 mica at acidic to neutral pH." Applied Clay Science **25**(3-4): 167-177.
- 39 Lagaly, G. (2006). "Colloid clay science." Developments in clay science **1**: 141-245.
- 40 Lagaly, G. and S. Ziesmer (2003). "Colloid chemistry of clay minerals: the coagulation of
41 montmorillonite dispersions." Advances in Colloid and Interface Science **100**: 105-
42 128.
- 43 Lake, B. A., K. M. Coolidge, et al. (2007). "Factors contributing to the internal loading of
44 phosphorus from anoxic sediments in six Maine, USA, lakes." Science of the Total
45 Environment **373**(2-3): 534-541.
- 46 Lorenz, M. G. and W. Wackernagel (1987). "Adsorption of DNA to Sand and Variable
47 Degradation Rates of Adsorbed DNA." Applied and Environmental Microbiology
48 **53**(12): 2948-2952.
- 49 Martin, R. B. (1985). "Nucleoside Sites for Transition-Metal Ion Binding." Accounts of
50 Chemical Research **18**(2): 32-38.

- Meunier, A., S. Petit, et al. (2010). "The Fe-Rich Clay Microsystems in Basalt-Komatiite Lavas: Importance of Fe-Smectites for Pre-Biotic Molecule Catalysis During the Hadean Eon." *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **40**(3): 253-272.
- Meyer, S., P. Levitz, et al. (2001). "A (N,V,T) Monte Carlo study of the long-range electrostatic coupling between a large collection of charged colloidal platelets." *Journal of Physical Chemistry B* **105**(39): 9595-9602.
- Michot, L., Bihannic, I., Thomas, F., Lartiges, B.S., Waldvogel, Y., Caillet, C., Thieme, J., Funari, S.S., Levitz, P. (in prep). "Coagulation of Na-montmorillonite by Inorganic Cations. A combined Transmission X-Ray microscopy, Small Angle and Wide Angle X-ray Scattering Study."
- Michot, L. J., I. Bihannic, et al. (2008). "Sol/gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the I/N transition." *Langmuir* **24**(7): 3127-3139.
- Michot, L. J., I. Bihannic, et al. (2006). "Liquid-crystalline aqueous clay suspensions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(44): 16101-16104.
- Michot, L. J., I. Bihannic, et al. (2004). "Phase diagrams of Wyoming Na-montmorillonite clay. Influence of particle anisotropy." *Langmuir* **20**(25): 10829-10837.
- Miller, I. R. (1961). "The structure of DNA and RNA in the water-mercury interface." *Journal of Molecular Biology* **3**: 229-240.
- Ogram, A. V., M. L. Mathot, et al. (1994). "Effects of DNA Polymer Length on Its Adsorption to Soils." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(2): 393-396.
- Orsini, L., Rémy, J.C. (1976). "Utilisation du chlorure de cobaltihexamine pour la détermination simultanée de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols " *Science du Sol* **4**: 269-275.
- Paineau, E., I. Bihannic, et al. (2011). "Aqueous Suspensions of Natural Swelling Clay Minerals. 1. Structure and Electrostatic Interactions." *Langmuir* **27**(9): 5562-5573.
- Romanowski, G., M. G. Lorenz, et al. (1991). "Adsorption of Plasmid DNA to Mineral Surfaces and Protection against Dnase-I." *Applied and Environmental Microbiology* **57**(4): 1057-1061.
- Rozalen, M., P. V. Brady, et al. (2009). "Surface chemistry of K-montmorillonite: Ionic strength, temperature dependence and dissolution kinetics." *Journal of Colloid and Interface Science* **333**(2): 474-484.
- Russell, M. J. and A. J. Hall (1997). "The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front." *Journal of the Geological Society* **154**: 377-402.
- Scappini, F., Casadei, F., Zamboni, R., Franchi, M., Gallori, E., Monti, S. (2004). "Protective effect of clay minerals on adsorbed nucleic acid against UV radiation: possible role in the origin of life." *International Journal of Astrobiology* **3**(1): 17-19.
- Sheng, G. Y., C. T. Johnston, et al. (2001). "Potential contributions of smectite clays and organic matter to pesticide retention in soils." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(6): 2899-2907.
- Swadling, J. B., P. V. Coveney, et al. (2010). "Clay minerals mediate folding and regioselective interactions of RNA: a large-scale atomistic simulation study." *Journal of the American Chemical Society* **132**(39): 13750-13764.
- Tetko, I. V. (2005). "Computing chemistry on the web." *Drug Discovery Today* **10**(22): 1497-1500.
- Tetko, I. V., J. Gasteiger, et al. (2005). "Virtual computational chemistry laboratory - design and description." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **19**(6): 453-463.

-
- 1 Thomas, F., L. J. Michot, et al. (1999). "Layer charge and electrophoretic mobility of
2 smectites." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **159**(2-
3 3): 351-358.
- 4 Tombacz, E. and M. Szekeres (2004). "Colloidal behavior of aqueous montmorillonite
5 suspensions: the specific role of pH in the presence of indifferent electrolytes."
6 Applied Clay Science **27**(1-2): 75-94.
- 7 Trevors, J. T. (1996). "DNA in soil: Adsorption, genetic transformation, molecular evolution
8 and genetic microchip." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General
9 and Molecular Microbiology **70**(1): 1-10.
- 10 Van Olphen, H. (1977). An Introduction to Clay Colloid Chemistry. New York.
- 11 Wattel-Koekkoek, E. J. W., P. P. L. van Genuchten, et al. (2001). "Amount and composition
12 of clay-associated soil organic matter in a range of kaolinitic and smectitic soils."
13 Geoderma **99**(1-2): 27-49.
- 14 Zarzycki, P. and F. Thomas (2006). "Theoretical study of the acid-base properties of the
15 montmorillonite/electrolyte interface: Influence of the surface heterogeneity and ionic
16 strength on the potentiometric titration curves." Journal of Colloid and Interface
17 Science **302**(2): 547-559.
- 18 Zeng, L., X. M. Li, et al. (2004). "Adsorptive removal of phosphate from aqueous solutions
19 using iron oxide tailings." Water Research **38**(5): 1318-1326
- 20

Table 1: Characteristics of the nucleotides. Phosphate groups protonate a second time below pH 1 for all nucleotides (a).

Abr.	Name	Molar mass (g/mol)	Solubility ^a		pKa	
			g/l	Mol/l	Site	pKa
AMP	Adenosine	347,2	3.3	$9,5 \times 10^{-3}$	N1	3.8 ^{b,c}
CMP	Cytidine	323,2	16.3	5×10^{-2}	N3	4.4 ^b
GMP	Guanosine	363,2	3.6	$9,8 \times 10^{-3}$	N7	2.4 ^{b,c}
					N1	9.5 ^b
					HPO ₄ ⁻	6.3 ^{b,c}
UMP	Uridine	324,2	12	$3,7 \times 10^{-2}$	N3	9.6 ^b
dGMP	Deoxyguanosine	347,2	2.7	$7,8 \times 10^{-3}$	N7	2.9 ^c
					N1	> 9 ^b
					HPO ₄ ⁻	6.4 ^c

a : Tetko 2005 ; b : Martin 1985 ; c : Danyluk 1968

Table 2: List of studied minerals, structures, structural formula, size, and Cation Exchange Capacities

Abr.	Name	Provenance	Structural formula	CEC (meq/100g)
SWy2	Montmorillonite	Wyoming	$(\text{Si}_{7.74}\text{Al}_{0.26})(\text{Al}_{3.06}\text{Fe}^{3+}_{0.42}\text{Fe}^{2+}_{0.03}\text{Mg}_{0.48})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{0.77}^{\text{a}}$	89 ^a
SAz1	Montmorillonite	Arizona	$(\text{Si}_{7.95}\text{Al}_{0.05})(\text{Al}_{2.75}\text{Fe}^{3+}_{0.17}\text{Mg}_{1.07})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{1.11}^{\text{a}}$	128 ^a
NAu1	Nontronite	Australia	$(\text{Si}_{6.98}\text{Al}_{0.95}\text{Fe}_{0.07})(\text{Al}_{0.36}\text{Fe}_{3.61}\text{Mg}_{0.04})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{1.05}^{\text{b}}$	113 ^c
NAu2	Nontronite	Australia	$(\text{Si}_{7.55}\text{Al}_{0.16}\text{Fe}_{0.29})(\text{Al}_{0.34}\text{Fe}_{3.54}\text{Mg}_{0.05})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{0.72}^{\text{b}}$	89 ^d
SBIId1	Beidellite	Idaho	$(\text{Si}_{7.27}\text{Al}_{0.73})(\text{Al}_{3.77}\text{Fe}^{3+}_{0.11}\text{Mg}_{0.21})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{0.67}^{\text{a}}$	83 ^a

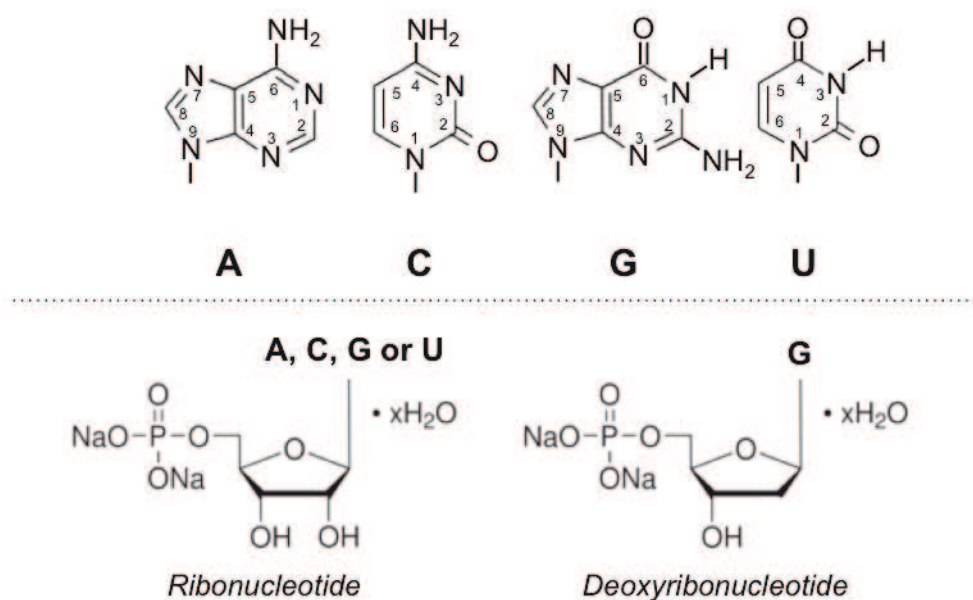
a : Paineau et al. 2011 ; b : Gates et al. 2002 ; c : Grybos et al. 2010 ; d : Michot et al. 2008

Table 3: Dimensions of studied clays and calculated specific surface areas for basal and edge faces. SA stands for surface area.

Abr.	Diam. (nm)	Length (nm)	Width (nm)	Height (nm)	Particles per g	Basal SA (m ² /g)	Edge SA (m ² /g)	Total SA (m ² /g)	Real SA (m ² /g)
SWy2	240 ^a	-	-	0.8 ^a	1,E+16	920± 30	6±1	925±30	236±30
SAz1	150 ^a	-	-	0.7 ^a	3E+16	1050± 40	10±1	1060±40	272±40
NAu1	-	460 ^b	60 ^b	0.76 ^b	1,6E+16	910 ± 30	13±2	925±30	240±30
NAu2	-	368 ^c	93 ^c	1 ^c	1,E+16	690±20	9±1	700±20	180±20

a : Paineau et al. 2011 ; b: Grybos et al. 2010 ; c : Michot et al. 2008

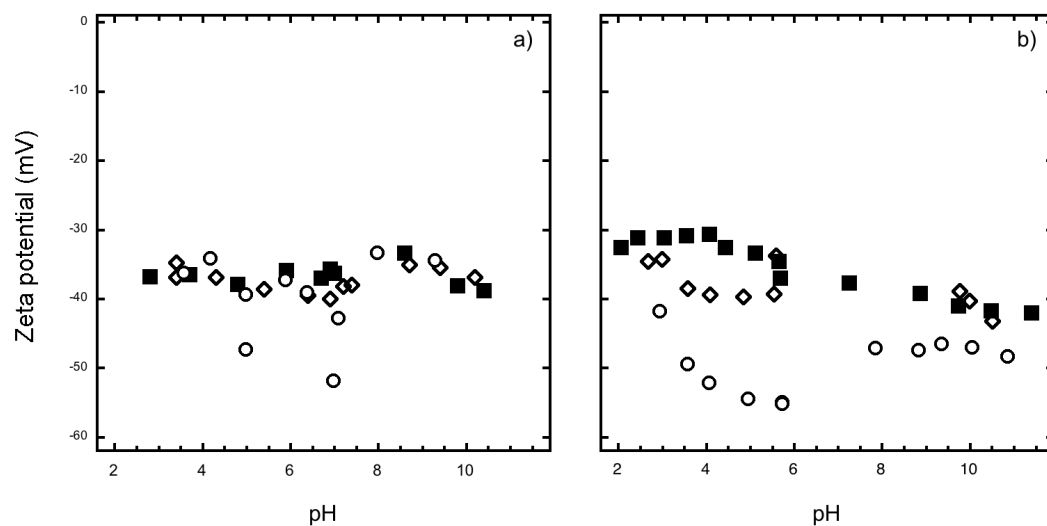
- 1 **Figure 1:** Nucleotides used in this study. Four ribonucleotides (AMP, CMP, GMP, UMP) and
- 2 one deoxyribonucleotide dGMP were studied.



3

4

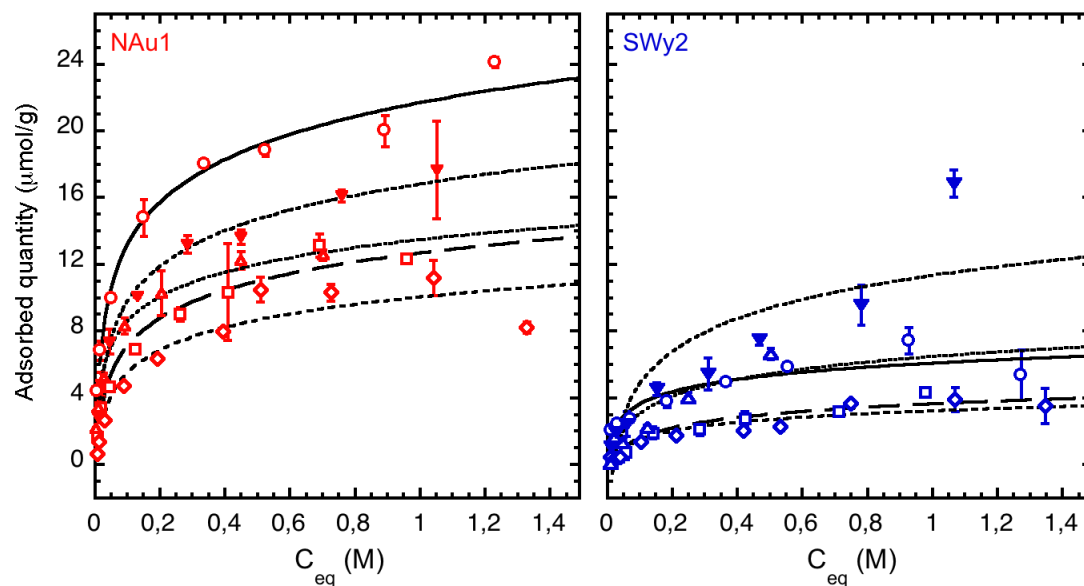
- 1 **Figure 2: Evolution of the Zeta potential with pH for montmorillonite SWy2 and**
 2 **nontronite NAu1.** a) Montmorillonite SWy2; Black squares: 10^{-3} M NaNO_3 ; Open diamonds:
 3 10^{-4} M NaNO_3 ; Open circles: 10^{-5} M NaNO_3 ; b) Nontronite NAu1; Black squares: 10^{-2} M
 4 NaCl ; Open diamonds: 10^{-3} M ; Open circles : 10^{-4} M NaCl .



5

6

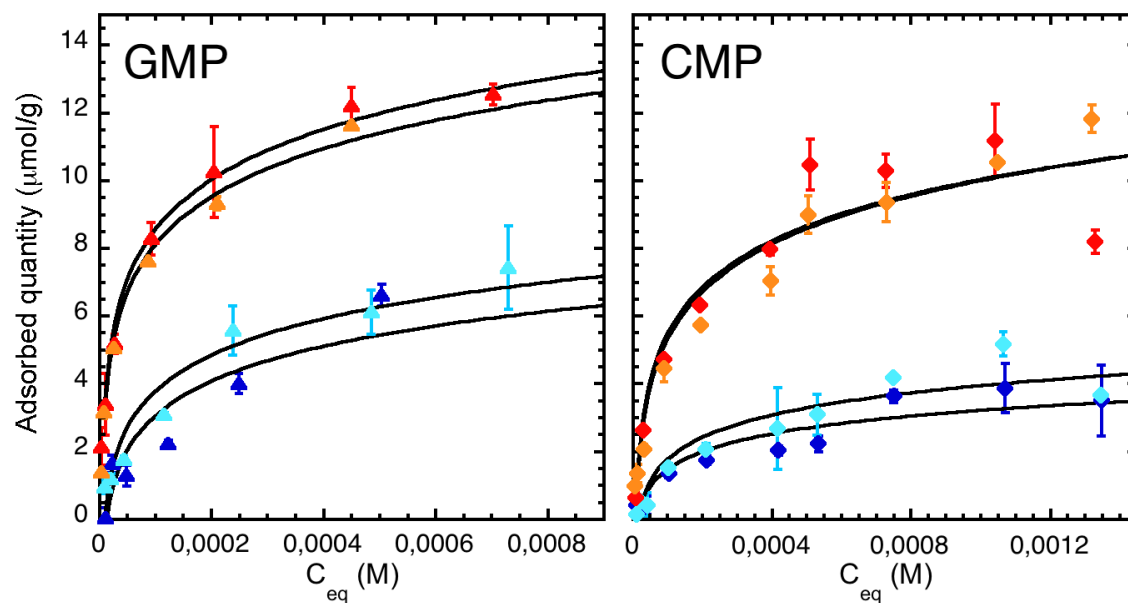
- 1 **Figure 3: Adsorption isotherms of AMP, CMP, UMP, GMP and dGMP for a) Nontronite**
 2 **NAu1, b) montmorillonite SWy2.** Adsorption experiments were achieved at pH 6.5, room
 3 temperature. Curves are intended as guides for the eyes.



4

5

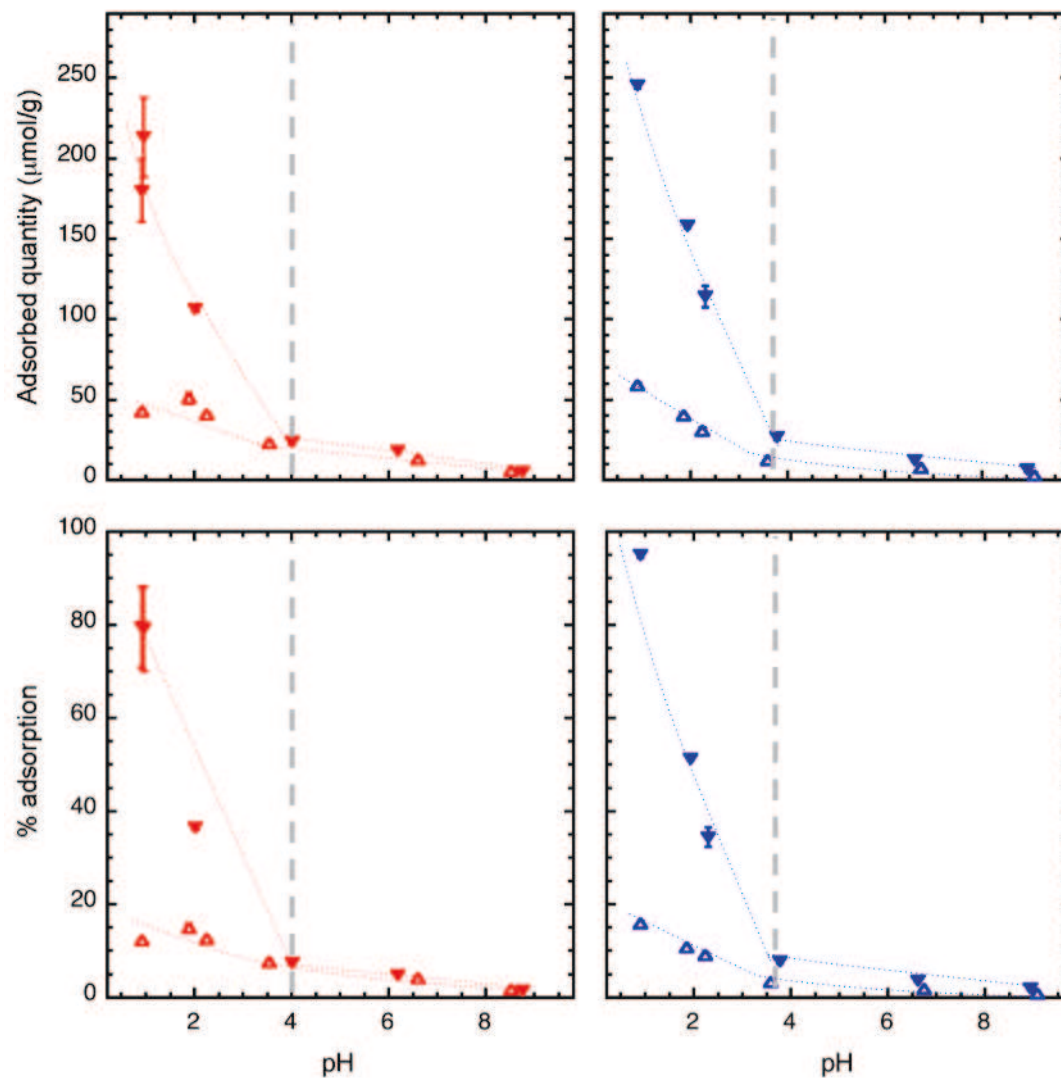
- 1 **Figure 4:** Adsorption isotherms of GMP and CMP for the 4 studied phyllosilicates.
- 2 Adsorption experiments were achieved at pH 6.5, room temperature.



3

4

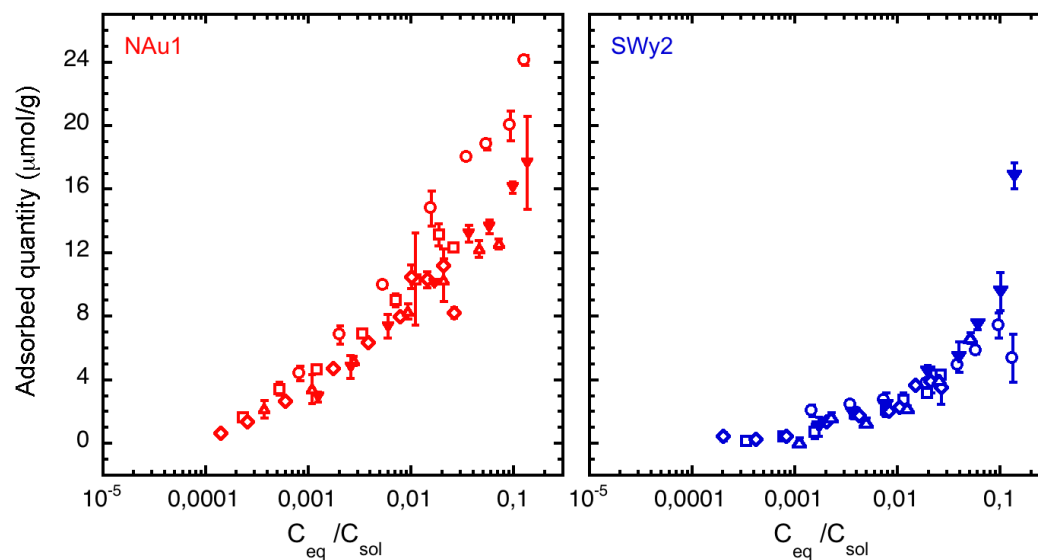
1 **Figure 5:** pH adsorption profiles of GMP and dGMP for a) N Au1 and b) SWy2.



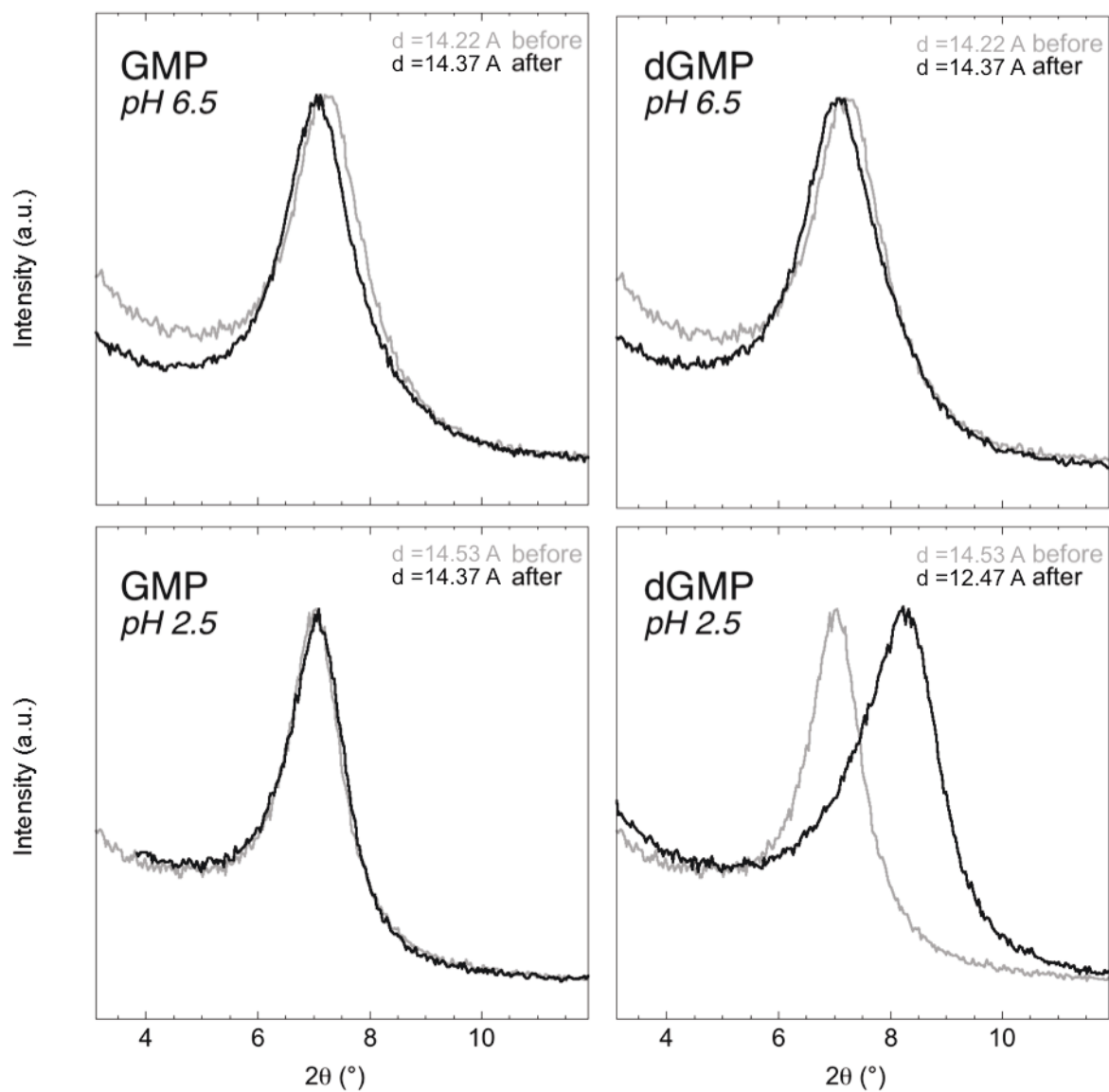
2

3

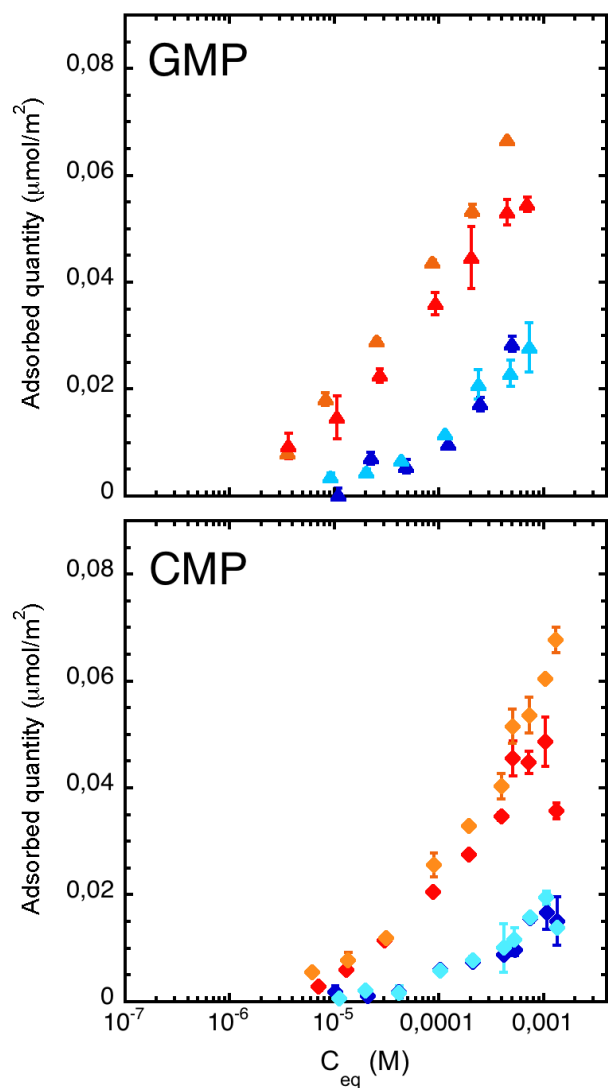
- 1 **Figure 6** : Superimposed adsorption isotherms of AMP, CMP, GMP, UMP and dGMP on
 2 Nontronite NAu1 and Montmorillonite SWy2. The x-axis is the normalized equilibrium
 3 concentration of nucleotides C_{eq}/C_{sol} .



- 1 **Figure 8 :** X-Ray Diffractograms of Nontronite NAu1 samples before and after adsorption of
2 GMP or dGMP achieved at ambient temperature and contrasted pH. A) pH 6, RT; B) pH 2,
3 RT.



- 1 **Figure 9** : Adsorption isotherms of a) GMP and b) CMP for the four studied minerals. The
- 2 specific surface areas are here the real total surface areas.

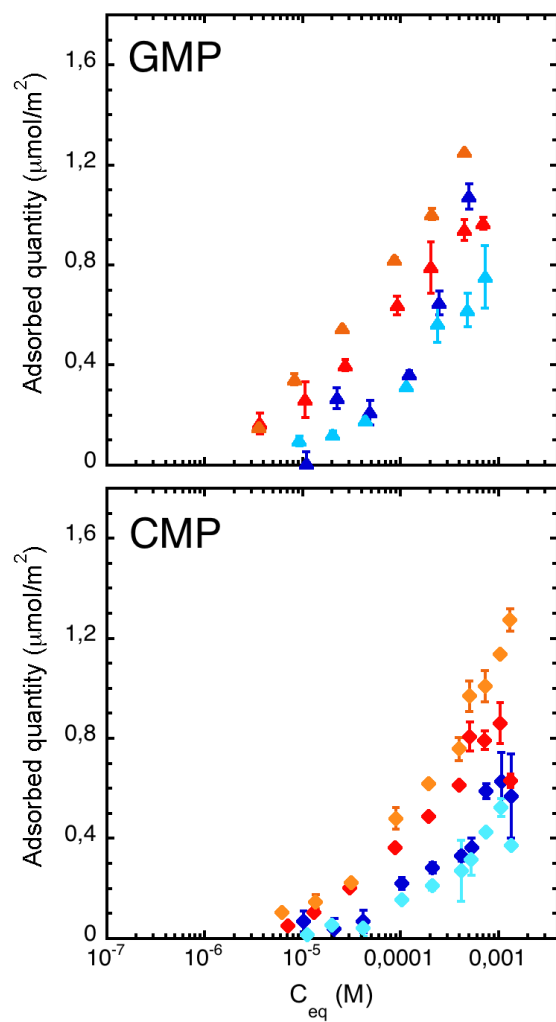


3

4

5

1 **Figure 10** : Adsorption of GMP and CMP, normalized to the lateral surface area.



III. Comparaison avec les argiles non-gonflantes et les serpentines

III.1. Mécanisme homologue pour tous les nucléotides ?

L'adsorption différentielle des nucléotides sur les surfaces de phyllosilicates peut refléter une différence de solubilité de ces nucléotides (Hashizume, van der Gaast et al. 2010). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons appliqué la méthode de Cases et al. (Cases and Villieras 1992) développée pour l'adsorption de surfactants. Les molécules adsorbées, ici les nucléotides, sont comparées à une phase de référence, ici une solution aqueuse saturée en nucléotide. La concentration en nucléotides dans la phase de référence est donc la solubilité de chaque nucléotide notée C_{sol} . On représente les données d'adsorption en fonction du rapport C_{eq}/C_{sol} , rapport de la concentration de l'adsorbat à l'équilibre C_{eq} sur la concentration de l'adsorbat dans la phase de référence C_{sol} . Si les molécules ont le même comportement sur la surface considérée, alors les isothermes d'adsorption se superposent (Figure IV – 1).

Pour un même minéral, on observe une superposition des isothermes d'adsorption des différents nucléotides. Cela suggère que le mécanisme d'adsorption est similaire pour tous les nucléotides. On se concentre donc par la suite à l'étude de l'adsorption de 2 nucléotides, GMP et CMP.

Quelques différences entre les nucléotides subsistent sur les surfaces de NAl, Pyr., et notamment Chrys. Nous tâcherons de les expliquer dans le paragraphe III.2.2.

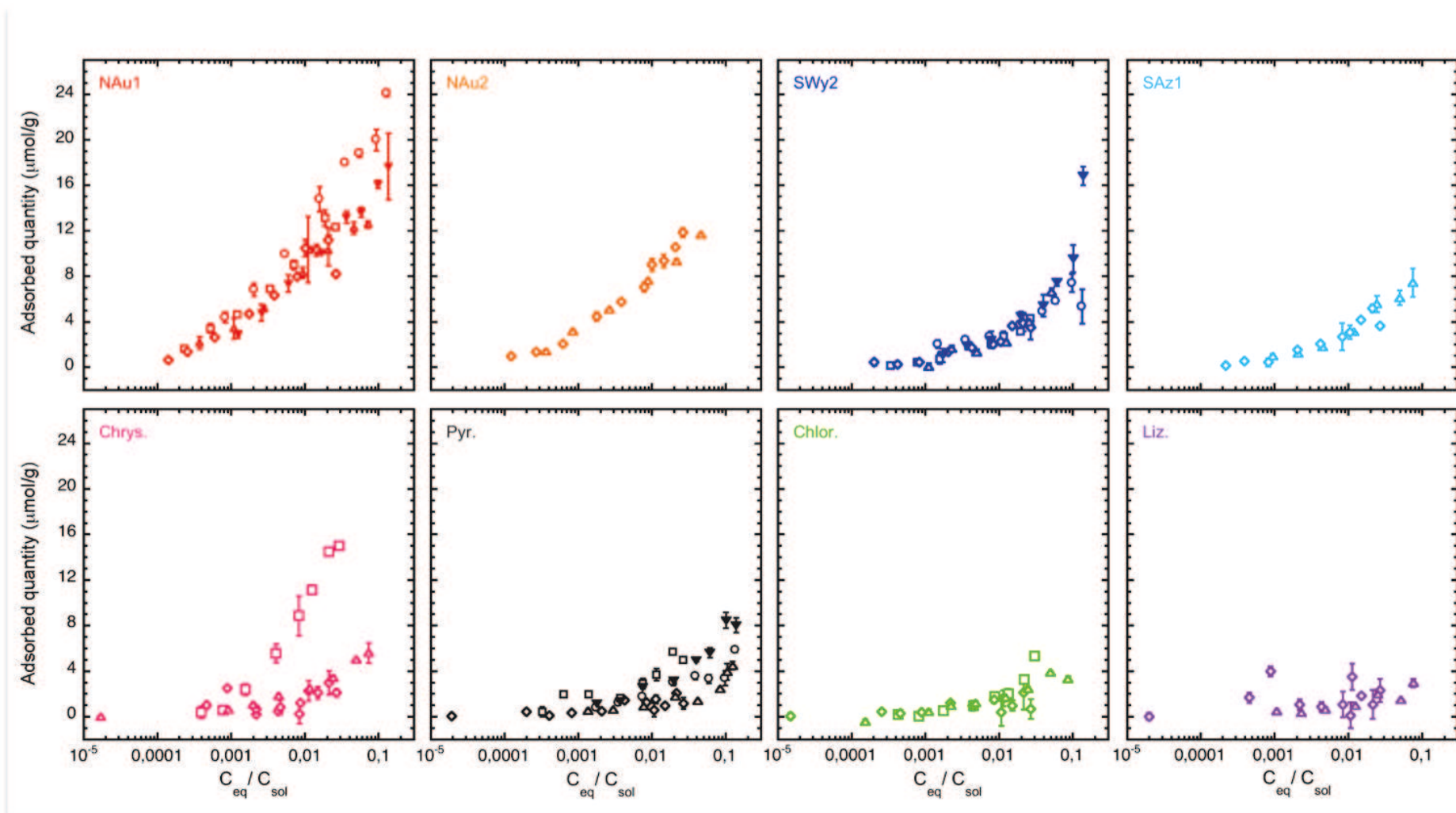


Figure IV – 1 : Isothermes d'adsorption en fonction de C_{eq}/C_{sol} , concentration d'équilibre normalisée par rapport à la solubilité du nucléotide. Les barres d'erreur sont comprises dans la tailles du symbole si elles ne sont pas visibles.

III.2. Quel mécanisme ?

III.1.1. Mécanisme d'adsorption principal à pH naturel

Nous concentrons notre étude sur 2 nucléotides, GMP et CMP, afin de déterminer le mécanisme principal d'adsorption.

Le nombre de sites d'adsorption est corrélé à la surface spécifique (Lahav and Chang 1976).

Nous avons donc normalisé les données d'adsorption à la surface spécifique totale réelle (Figure IV–2).

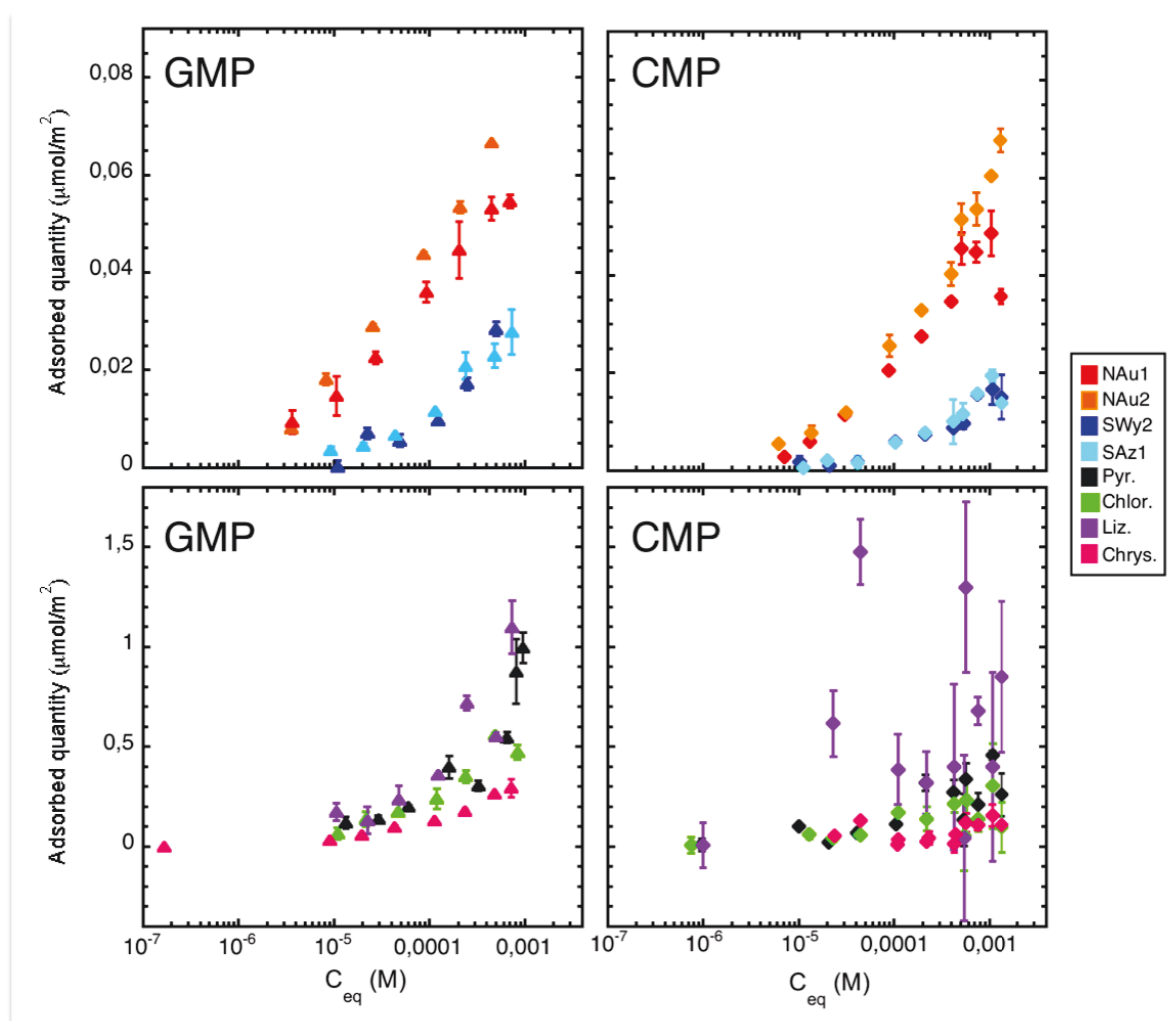


Figure IV - 2 : Adsorption de GMP et CMP normalisée à la surface totale. (Haut = nontronites et montmorillonites; Bas = Chlor. et Pyr., serpentines Liz. et Chrys.)

Les nontronites adsorbent plus de nucléotides que les montmorillonites par m^2 de surface totale, mais les quantités adsorbées sont faibles ($< 0,08 \mu\text{mol}/\text{m}^2$). Les argiles non-gonflantes et les serpentines (**Figure IV-2**) adsorbent d'avantage de nucléotides que les nontronites et montmorillonites par m^2 de surface totale, entre $0,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ pour le chrysotile et $1,1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ pour la lizardite et la pyrophyllite.

Les résultats de DRX indiquent l'absence d'intercalation des nucléotides dans l'espaces interfoliaire des smectites. De plus, les 2 nontronites adsorbent les mêmes quantités de nucléotides malgré des charges structurales différentes, indiquées par des CEC de 113 et 89 meq/100g. Le même comportement est observé chez les montmorillonites. Le plan basal n'intervient donc pas majoritairement, et il est donc probable que l'adsorption à pH naturel se fasse plutôt sur les sites Si-OH, Al-OH, Mg-OH et Fe-OH des faces latérales via les groupes phosphate chargés négativement. Plusieurs études mentionnent en effet une adsorption massive de phosphate par les sites de type « oxyde métallique » des faces latérales des phyllosilicates (Borggaard, Jorgensen et al. 1990; Gimsing and Borggaard 2002; Kasama, Watanabe et al. 2004; Zeng, Li et al. 2004). Nous avons donc normalisé les données d'adsorption à la surface latérale de chaque minéral (**Figure IV – 3**).

Les nontronites adsorbent toujours plus de nucléotides que les montmorillonites par m^2 de surface latérale, mais la différence entre les deux minéraux s'amointrit. De façon similaire, on observe chez les phyllosilicates non gonflants une quasi superposition des isothermes d'adsorption normalisées aux surfaces latérales (**Figure IV-3 bas**). Seul le chrysotile semble avoir un comportement un peu différent, car l'isotherme d'adsorption de GMP ne se superpose pas aux données d'adsorption sur les autres surfaces (**Figure IV-3 bas**). De plus, les quantités adsorbées par m^2 de surface latérale chez les argiles gonflantes sont très proches de celles observées chez les argiles non-gonflantes et les serpentines (**Figure IV-4**). Les isothermes d'adsorption des nucléotides sur les nontronites et sur les phyllosilicates ferro-

magnésiens non-gonflants se superposent (**Figure IV-4**) (à l'exception de l'isotherme d'adsorption de GMP sur le chrysotile).

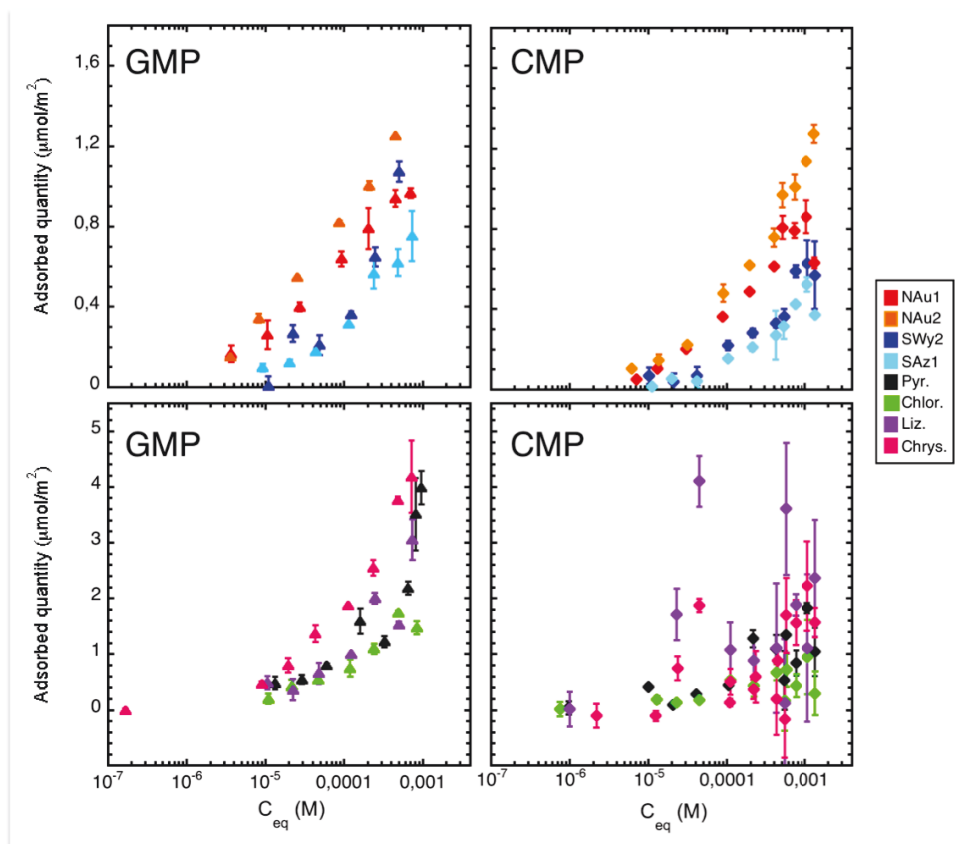


Figure IV - 3 : Adsorption de GMP et CMP normalisée à la surface latérale. (Haut = nontronites et montmorillonites; Bas = Chlor. et Pyr., serpentines Liz. et Chrys.)

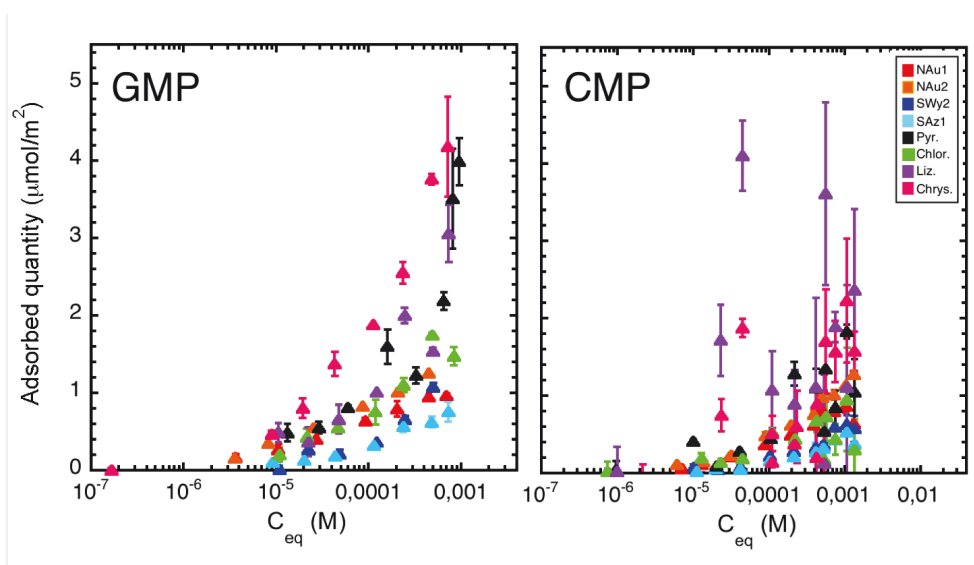


Figure IV - 4 : Adsorption de GMP et CMP normalisée à la surface latérale : Comparaison des argiles gonflantes avec les argiles non-gonflantes et les serpentines .

L'adsorption sur les faces latérales est donc le mécanisme principal d'adsorption des nucléotides sur les phyllosilicates ferro-magnésiens. A pH 6.5, cette adsorption se ferait par échange de ligand entre les groupes phosphates et les sites amphotériques des faces latérales (Gimsing and Borggaard 2002; Kasama, Watanabe et al. 2004; Zeng, Li et al. 2004). Les groupements $-OH$ structuraux des sites latéraux du phyllosilicate sont remplacés par les oxygènes du groupe phosphate (**Figure IV - 5**).

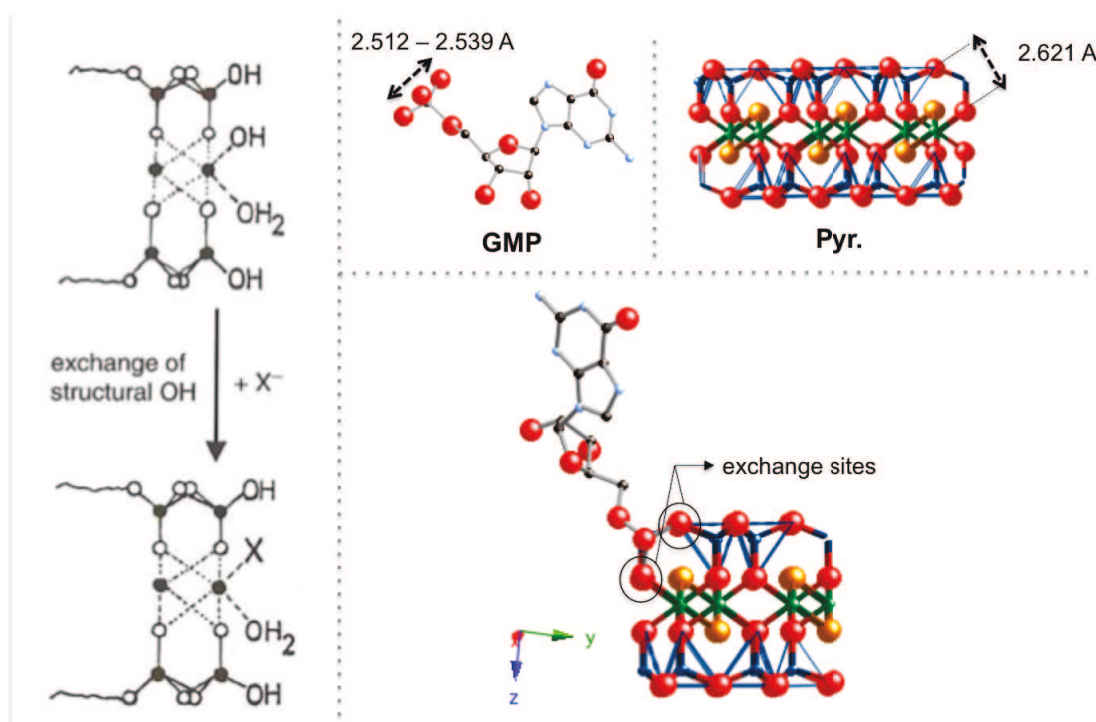


Figure IV - 5 : Adsorption par échange de ligand (d'après Lagaly 2006) ; exemple de l'adsorption de GMP sur la pyrophyllite (rouge = O, vert = Al, bleu = Si, jaune = OH).

III.2.2. Explication des différences observées sur Chrys., Pyr. et Nau1

Si les différences de solubilité des nucléotides expliquent l'adsorption différentielle des nucléotides sur la plupart des surfaces, quelques contrastes subsistent entre les nucléotides sur les surfaces de nontronite NAu1, pyrophyllite Pyr., et surtout chrysotile Chrys.

Pour la nontronite et la pyrophyllite, la dispersion des données est relativement faible et pourrait donc s'expliquer à la fois par l'incertitude de calcul des solubilités, et par de faibles pourcentages d'adsorption à pH 6.5 (2 % et 5% environ pour Pyr. et NAl1, respectivement). Nous avons toutefois tenté d'expliquer pourquoi le désoxyribonucléotide dGMP s'adsorbe d'avantage que son homologue ribonucléotide GMP sur la surface de la pyrophyllite. Nous utilisons Crystal Maker, logiciel de représentation graphique des minéraux et biomolécules, qui permet de mesurer les distances entre les atomes. Les mécanismes d'adsorption possibles sur la surface de la pyrophyllite et susceptibles d'expliquer cette différence sont représentés en **Figure IV - 6**.

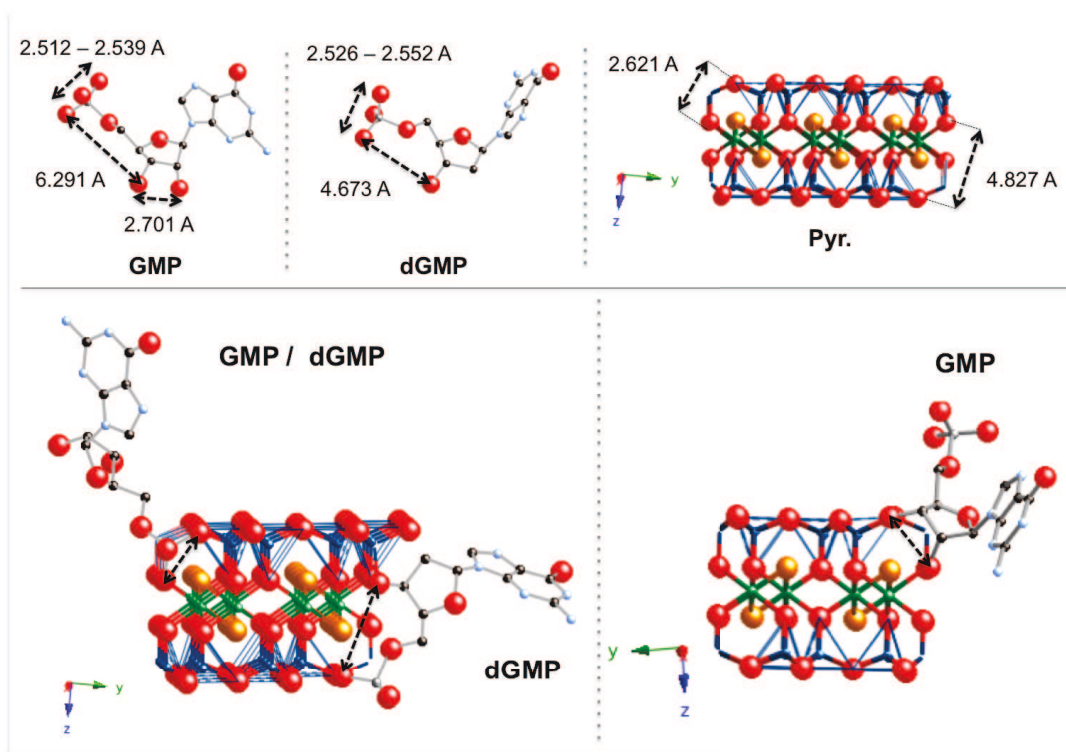


Figure IV - 6: Mécanismes proposés pour l'adsorption de GMP et dGMP sur les faces latérales d'un feuillet de pyrophyllite (O = rouge, OH = orange, Si = bleu foncé, Al = vert, C = noir, N = bleu clair, P = gris)

La perte d'un groupement hydroxyle sur la molécule de dGMP entraîne un rapprochement notable entre le groupe hydroxyle restant et un oxygène du groupe phosphate. La distance entre les 2 groupes est de 6.29 Å pour GMP, mais est seulement de 4.67 Å pour dGMP, ce qui est très proche de la distance de 4.83 Å mesurée entre un groupe Si-OH et un groupe Al-OH

des faces latérales (**Figure IV-6**). Le nucléotide dGMP semble donc pouvoir s'adsorber sur la pyrophyllite par un second mode d'adsorption. Cependant, un second mode d'adsorption semble être également possible pour GMP. En effet, les groupes hydroxyles du ribose sont espacés de 2.70 Å, et une adsorption sur les sites Si-OH des faces latérales, espacés de 2.62 Å, est envisageable (**Figure IV - 6**). Il n'est pas possible à ce stade du travail de trancher.

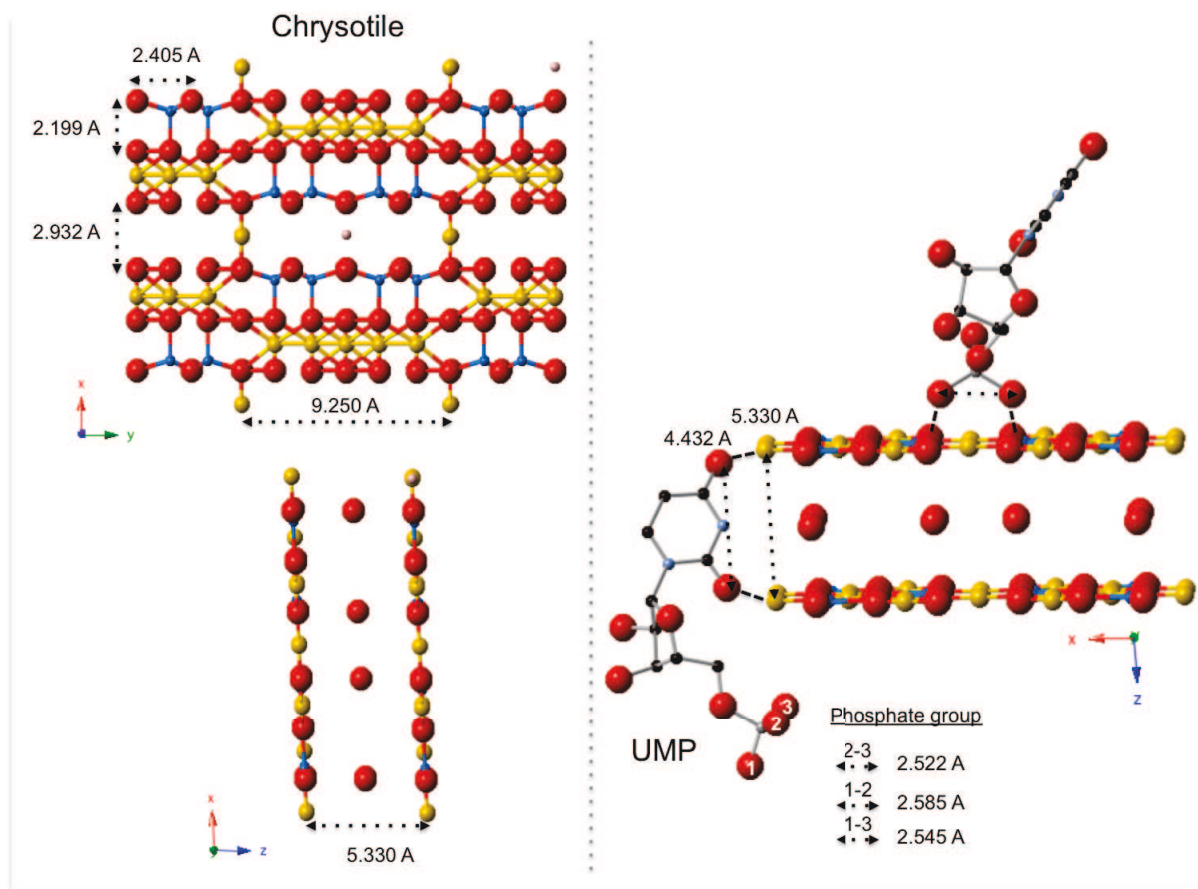


Figure IV - 7: Structures du chrysotile et de l'UMP, et mécanismes d'adsorption possibles. (C = noir, N = bleu clair, P = gris, O = rouge, Si = bleu foncé, Mg = jaune)

Sur la surface du chrysotile, la forte différence entre l'isotherme d'adsorption de l'UMP et celles de GMP et CMP ne peut pas être expliquée par les faibles pourcentages d'adsorption. Le chrysotile est le seul phyllosilicate étudié qui possède une organisation spatiale des feuilletés en nanotubes. Nous avons comparé les longueurs des distances atomiques de la molécule d'UMP et du chrysotile (Warren 1931) (**Figure IV – 7**). L'UMP possède sur la base

azotée 2 groupements O espacés de 4.43 Å. Les fibres de chrysotile sont structurées en couches de feuillets enroulées concentriques, séparées ici de 5.33 Å. Devouard et al. (Devouard and Baronnet 1995) rapportent d'autre part des distances d_{020} de 4.5 Å, plus proches de la longueur entre les deux O de la base uracile de 4.43 Å. Il serait donc possible pour l'UMP de s'adsorber en surface du chrysotile via ces 2 groupes O, chacun adsorbé sur une couche de feuillets.

III.2.3. Que se passe-t-il à pH acide ?

A pH acide, seules les argiles gonflantes présentent une nette variation de l'adsorption de GMP et dGMP. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette hausse d'adsorption à bas pH.

- 1) Les sites amphotériques des faces latérales atteignent leur point de charge zéro et acquièrent une ou des charges positives, entraînant ainsi une hausse de l'adsorption par le groupe phosphate.
- 2) De l'échange ionique s'effectue entre les cations compensateurs sur le plan basal et les nucléotides ayant acquis une charge positive au niveau de la base azotée.

L'hypothèse 1 pourrait expliquer les résultats d'adsorption observés pour les smectites uniquement. Le point de charge zéro des faces latérales de la montmorillonite n'est pas bien contraint, et pourrait être compris entre 3.6 et 7 (Thomas, Michot et al. 1999; Tombacz and Szekeres 2004; Lagaly 2006), ce qui pourrait expliquer une hausse de l'adsorption en dessous de pH 4. Cependant, les faces latérales de la pyrophyllite présentent un point de charge zéro des à pH 4,2 (Keren and Sparks 1995). Or, les argiles non gonflantes et les serpentines présentent une adsorption constante sur la gamme de pH étudiée. S'il s'agissait uniquement d'adsorption sur les faces latérales, une hausse de l'adsorption devrait être également observée pour la pyrophyllite, ce qui n'est pas le cas. La seconde hypothèse, l'échange ionique, semble donc être le mécanisme le plus probable.

Toutefois, les pKa de GMP et dGMP pH 2,4 et 2,9, respectivement, indiqueraient que l'échange ionique n'est possible qu'en dessous de pH 2,4. Il a cependant été montré que les espèces adsorbées se comportent parfois différemment en solution et dans la couche de molécules adsorbées. Par exemple, des pourcentages importants d'arsénite As(III) s'adsorbent en surface de magnétite de pH 4 à pH 10 malgré un pKa de 9,2 (Sverjensky and Fukushima 2006).

La hausse de l'adsorption à pH acide est plus importante pour les désoxyribonucléotides dGMP que pour les ribonucléotides GMP. Le sucre doit donc intervenir dans l'adsorption à ces pH. Le ribose constitue peut être une gêne stérique plus importante que le 2'-désoxyribose quant à l'adsorption en surface des smectites.

Références bibliographiques

- Banin, A., J. G. Lawless, et al. (1985). "Ph Profile of the Adsorption of Nucleotides onto Montmorillonite .2. Adsorption and Desorption of 5'-Amp in Iron-Calcium Montmorillonite Systems." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **15**(2): 89-101.
- Bezanilla, M., S. Manne, et al. (1995). "Adsorption of DNA to Mica, Silylated Mica, and Minerals - Characterization by Atomic-Force Microscopy." *Langmuir* **11**(2): 655-659.
- Borggaard, O. K., S. S. Jorgensen, et al. (1990). "Influence of Organic-Matter on Phosphate Adsorption by Aluminum and Iron-Oxides in Sandy Soils." *Journal of Soil Science* **41**(3): 443-449.
- Cai, P., Q. Huang, et al. (2006). "Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol." *Soil Biology & Biochemistry* **38**(3): 471-476.
- Cases, J. M. and F. Villieras (1992). "Thermodynamic Model of Ionic and Nonionic Surfactant Adsorption Abstraction on Heterogeneous Surfaces." *Langmuir* **8**(5): 1251-1264.
- Cleaves, H. J., E. Crapster-Pregont, et al. (2011). "The adsorption of short single-stranded DNA oligomers to mineral surfaces." *Chemosphere* **83**(11): 1560-1567.
- Cleaves, H. J., C. M. Jonsson, et al. (2010). "Adsorption of Nucleic Acid Components on Rutile (TiO₂) Surfaces." *Astrobiology* **10**(3): 311-323.
- Cockell, C. S. (1998). "Biological effects of high ultraviolet radiation on early Earth - a theoretical evaluation." *Journal of Theoretical Biology* **193**(4): 717-729.
- Cohn, C. A., T. K. Hansson, et al. (2001). "Fate of prebiotic adenine." *Astrobiology* **1**(4): 477-480.
- Devouard, B. and A. Baronnet (1995). "Axial Diffraction of Curved Lattices - Geometrical and Numerical Modeling - Application to Chrysotile." *European Journal of Mineralogy* **7**(4): 835-846.
- Ferris, J. P. (1999). "Prebiotic synthesis on minerals: Bridging the prebiotic and RNA worlds." *Biological Bulletin* **196**(3): 311-314.
- Ferris, J. P. (2005). "Mineral catalysis and prebiotic synthesis: Montmorillonite-catalyzed formation of RNA." *Elements* **1**(3): 145-149.
- Ferris, J. P., G. Ertem, et al. (1989). "The Adsorption of Nucleotides and Polynucleotides on Montmorillonite Clay." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **19**(2): 153-164.
- Ferris, J. P. and W. J. Hagan (1986). "The Adsorption and Reaction of Adenine-Nucleotides on Montmorillonite." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **17**(1): 69-84.
- Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Canto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C., Stotzky, G. (1994). "Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil." *FEMS Microbiology Ecology* **15**(1-2): 119-126.
- Gimsing, A. L. and O. K. Borggaard (2002). "Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides." *Clay Minerals* **37**(3): 509-515.
- Hashizume, H., S. van der Gaast, et al. (2010). "Adsorption of adenine, cytosine, uracil, ribose, and phosphate by Mg-exchanged montmorillonite." *Clay Minerals* **45**(4): 469-475.
- Hatton, B. and D. Rickard (2008). "Nucleic acids bind to nanoparticulate iron (II) monosulphide in aqueous solutions." *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **38**(3): 257-270.
- Hazen, R. M., D. Papineau, et al. (2008). "Mineral evolution." *American Mineralogist* **93**(11-12): 1693-1720.

- Hazen, R. M. and D. A. Sverjensky (2010). "Mineral Surfaces, Geochemical Complexities, and the Origins of Life." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **2**(5).
- Holm, N. G., G. Ertem, et al. (1993). "The Binding and Reactions of Nucleotides and Polynucleotides on Iron-Oxide Hydroxide Polymorphs." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **23**(3): 195-215.
- Kasama, T., Y. Watanabe, et al. (2004). "Sorption of phosphates on Al-pillared smectites and mica at acidic to neutral pH." Applied Clay Science **25**(3-4): 167-177.
- Keren, R. and D. L. Sparks (1995). "The Role of Edge Surfaces in Flocculation of 2-1 Clay-Minerals." Soil Science Society of America Journal **59**(2): 430-435.
- Lagaly, G. (2006). "Colloid clay science." Developments in clay science **1**: 141-245.
- Lahav, N. and S. Chang (1976). "The possible role of solid surface area in condensation reactions during chemical evolution: reevaluation." Journal of Molecular Evolution **8**(4): 357-380.
- Lambert, J. F. (2008). "Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review." Origins of Life and Evolution of Biospheres **38**(3): 211-242.
- Lawless, J. G., A. Banin, et al. (1985). "Ph Profile of the Adsorption of Nucleotides onto Montmorillonite .1. Selected Homoionic Clays." Origins of Life and Evolution of the Biosphere **15**(2): 77-88.
- Lorenz, M. G. and W. Wackernagel (1987). "Adsorption of DNA to Sand and Variable Degradation Rates of Adsorbed DNA." Applied and Environmental Microbiology **53**(12): 2948-2952.
- Meunier, A., S. Petit, et al. (2010). "The Fe-Rich Clay Microsystems in Basalt-Komatiite Lavas: Importance of Fe-Smectites for Pre-Biotic Molecule Catalysis During the Hadean Eon." Origins of Life and Evolution of Biospheres **40**(3): 253-272.
- Mignon, P., P. Ugliengo, et al. (2009). "Theoretical Study of the Adsorption of RNA/DNA Bases on the External Surfaces of Na⁺-Montmorillonite." Journal of Physical Chemistry C **113**(31): 13741-13749.
- Romanowski, G., M. G. Lorenz, et al. (1991). "Adsorption of Plasmid DNA to Mineral Surfaces and Protection against Dnase-I." Applied and Environmental Microbiology **57**(4): 1057-1061.
- Saladino, R., C. Crestini, et al. (2005). "On the prebiotic synthesis of nucleobases, nucleotides, oligonucleotides, Pre-RNA and Pre-DNA molecules." Prebiotic Chemistry: From Simple Amphiphiles to Protocell Models **259**: 29-68.
- Scappini, F., Casadei, F., Zamboni, R., Franchi, M., Gallori, E., Monti, S. (2004). "Protective effect of clay minerals on adsorbed nucleic acid against UV radiation: possible role in the origin of life." International Journal of Astrobiology **3**(1): 17-19.
- Sverjensky, D. A. and K. Fukushi (2006). "A predictive model (ETLM) for As(III) adsorption and surface speciation on oxides consistent with spectroscopic data." Geochimica Et Cosmochimica Acta **70**(15): 3778-3802.
- Thomas, F., L. J. Michot, et al. (1999). "Layer charge and electrophoretic mobility of smectites." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **159**(2-3): 351-358.
- Tombacz, E. and M. Szekeres (2004). "Colloidal behavior of aqueous montmorillonite suspensions: the specific role of pH in the presence of indifferent electrolytes." Applied Clay Science **27**(1-2): 75-94.
- Trevors, J. T. (1996). "DNA in soil: Adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **70**(1): 1-10.

-
- Warren, B. E., Bragg, W.L. (1931). "The crystal structure of chrysotile $H_4 Mg_3 Si_2 O_9$ " Zeitschrift fuer Kristallographie, Kristallgeometrie, Kristallphysik, Kristallchemie **76**: 201-210.
- Zeng, L., X. M. Li, et al. (2004). "Adsorptive removal of phosphate from aqueous solutions using iron oxide tailings." Water Research **38**(5): 1318-1326.

Conclusions et perspectives

Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis d'une part de préciser **le mécanisme d'adsorption** des nucléotides en surface des phyllosilicates ferromagnésiens, et d'autre part de mettre en évidence des **conditions environnementales** favorisant cette adsorption.

L'adsorption différentielle entre les nucléotides observée à pH naturel est expliquée en grande majorité par leur différence de solubilité. Les mécanismes d'adsorption des nucléotides sont donc similaires. Les faces latérales des particules de phyllosilicates apparaissent comme le site d'adsorption principal à pH naturel. L'adsorption s'y ferait majoritairement par échange de ligand entre les O des groupes phosphates et les sites amphotériques Si-OH, Al-OH, Mg-OH et Fe-OH. Le fait que les nontronites adsorbent plus de 2 fois plus de nucléotides que les montmorillonites suggère une plus forte affinité des groupes phosphates pour les sites Fe-OH.

Une partie des données n'est cependant pas expliquée par les différences de solubilité. Pour la pyrophyllite Pyr. et la nontronite NAu1, les données sont suffisamment peu différentes pour que cela puisse s'expliquer soit par l'incertitude de calcul des solubilités, soit les faibles pourcentages d'adsorption, entre 2 et 5% selon le minéral considéré. Des mesures expérimentales précises des solubilités des nucléotides permettraient de répondre à cette question. En surface du chrysotile, l'adsorption de l'UMP diffère nettement des autres nucléotides. Cela pourrait être dû à un second mécanisme d'adsorption via la base uracile, liée par ses oxygènes à 2 couches consécutives de feuillets enroulés.

A pH acide, les quantités de nucléotides adsorbées augmentent considérablement, sur les smectites. Cela peut être expliqué par un processus d'échange ionique. Les désoxyribonucléotides dGMP sont adsorbés 4 fois plus que les ribonucléotides GMP à bas

pH. Il serait utile d'étudier les autres désoxyribonucléotides afin de confirmer ou d'infirmer cette tendance et d'expliquer les différences le cas échéant.

Nous avons également mis en évidence des **conditions environnementales optimales** pour l'adsorption des nucléotides en surface des phyllosilicates ferro-magnésiens.

Si la salinité n'influe globalement pas sur l'adsorption, un optimum d'adsorption est observé à pH 6.5 quand la température atteint 40 à 60°C. A pH acide, on n'observe pas de variations notables pour les argiles non-gonflantes et les serpentines. En revanche, les argiles gonflantes présentent une très nette hausse de l'adsorption en dessous de pH 4, allant jusqu'à 80% d'adsorption pour la nontronite et 95% d'adsorption pour la montmorillonite à pH 1.

Une hausse de température à bas pH accentue encore l'augmentation de l'adsorption des nucléotides sur les argiles gonflantes. La montmorillonite adsorbe alors la totalité des nucléotides présents en solution au dessus de 40°C. Sur la nontronite, des pourcentages d'adsorption de 40 à 60% sont atteints, bien supérieurs aux 5% d'adsorption observés à pH 6.5.

Ces conditions d'adsorption maximales, à pH bas et hautes températures, ne sont pas sans rappeler les conditions hydrothermales rencontrées dans un contexte de **fumeur noir** même s'il est difficile d'aller plus loin à ce stade.

A partir des résultats de ce travail, les perspectives sont nombreuses. Je propose plusieurs pistes afin de mieux appréhender et comprendre l'adsorption et la polymérisation des acides nucléiques sur les surfaces minérales.

Si les interactions des acides aminés avec les surfaces minérales sont globalement bien comprises (Lambert 2008; Jonsson, Jonsson et al. 2009; Bahri, Jonsson et al. 2011), les mécanismes d'adsorption des acides nucléiques ne sont pas encore complètement connus.

Les désoxyribonucléotides devraient tous être étudiés afin de répondre aux deux

questions suivantes :

- la différence observée entre dGMP et GMP à faible pH est-elle vraie pour les autres dNMP ? si oui, quel est le rôle du sucre dans l'adsorption à bas pH ?
- observe-t-on la même adsorption différentielles des nucléotides les uns par rapport aux autres ? Il serait nécessaire de mesurer les solubilités de tous les nucléotides dans des conditions similaires.

D'autres minéraux devront également être testés comme surface d'adsorption, par exemple la saponite importante en contexte hydrothermal (Percival and Ames 1993).

Deuxièmement, il serait intéressant de tirer profit de la spectroscopie SERS, développée en première partie de ce manuscrit, afin d'étudier l'adsorption des acides nucléiques. Cette spectroscopie bénéficie d'un effet d'amplification de surface, et les signaux observés permettraient d'identifier de manière irréfutable les groupements servant de point d'attache. Cette méthode a été utilisée avec succès pour étudier l'adsorption de la dopamine sur des surfaces de rutile (Bahri, Jonsson et al. 2011; Hurst, Fry et al. 2011). Je propose donc de tester tout d'abord le rutile en tant que substrat SERS pour l'adsorption d'acides nucléiques, puis des particules de phyllosilicates riches en fer et magnésium pourront être également testées, notamment la nontronite qui est très riche en fer.

Des conditions environnementales supplémentaires devront être étudiées, notamment la pression et l'état d'oxydation, afin de se placer en conditions hydrothermales. Dans les systèmes hydrothermaux actuels la pression est comprise entre 250 et 450 bars (Kasting, Howard et al. 2006). Lee et al. (Lee N. soumis) ont montré que l'état d'oxydation, contrôlé en imposant une concentration en H_2 dans le fluide, influe sur la stabilité des acides aminés en conditions hydrothermales. Des expériences similaires sur les acides nucléiques permettraient de plus d'évaluer le potentiel de préservation des surfaces minérales.

Enfin, si la montmorillonite a été abondamment étudiée en tant que catalyseur de la

réaction de polymérisation des acides nucléiques, il serait intéressant de tester les capacités catalytiques de phyllosilicates ferro-magnésien plus pertinents dans l'environnement océanique Hadéen/Archéen.

Références bibliographiques

- Bahri, S., C. M. Jonsson, et al. (2011). "Adsorption and Surface Complexation Study of L-DOPA on Rutile (α -TiO₂) in NaCl Solutions." *Environmental Science & Technology* **45**(9): 3959-3966.
- Hurst, S. J., H. C. Fry, et al. (2011). "Utilizing Chemical Raman Enhancement: A Route for Metal Oxide Support-Based Biodetection." *Journal of Physical Chemistry C* **115**(3): 620-630.
- Jonsson, C. M., C. L. Jonsson, et al. (2009). "Attachment of L-Glutamate to Rutile (α -TiO₂): A Potentiometric, Adsorption, and Surface Complexation Study." *Langmuir* **25**(20): 12127-12135.
- Kasting, J. F., M. T. Howard, et al. (2006). "Paleoclimates, ocean depth, and the oxygen isotopic composition of seawater." *Earth and Planetary Science Letters* **252**(1-2): 82-93.
- Lambert, J. F. (2008). "Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review." *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **38**(3): 211-242.
- Lee N., F. D. I., Sverjensky D.A., Cody G.D. et Hazen R.M (soumis). "Hydrogen Enhances the Stability of Amino Acids In Hydrothermal Environments." soumis à EPSL.
- Percival, J. B. and D. E. Ames (1993). "Clay Mineralogy of Active Hydrothermal Chimneys and an Associated Mound, Middle Valley, Northern Juan-De-Fuca Ridge." *Canadian Mineralogist* **31**: 957-971.

Liste des figures

PARTIE I

Figure		p.
I-1	Fossiles morphologiques vs fossiles moléculaires	13
I-2	Présentation des acides nucléiques (Structures 2D, appariement)	19
I-3	Dégradations fréquentes de l'ADN ancien	22
I-4	Principe de la PCR.	26
I-5	Méthodes de séquençage de deuxième génération	29
I-6	Méthodes de séquençage de molécule unique	31
I-7	Jumping PCR, artéfact d'amplification fréquent	36
I-8	Reconstruction enzymatique par polymérisation	38
I-9	Exemple de réparation d'ADN par action conjointe de 2 enzymes, l'uracile-N-glycosylase et l'endonucléase VIII	40
I-10	Diagramme énergétique de Jablonski	43
I-11	Amplification du champ électromagnétique en surface de nanoparticules métalliques de formes variées sous l'excitation par l'onde électromagnétique E.	45
I-12	Résonance du plasmon dipolaire de surface	46
I-13	Spectres SERS d'un mélange d'adénine et de riboflavine, acquis avec une longueur d'onde d'excitation de 785 et 532 nm	47
I-14	Principaux types de surfaces actives pour le SERS	49
I-15	Spectres SERS de la molécule 1,4-Benzènedithiol obtenus avec des nanocubes d'argent avec des tailles différentes de 57, 82, 125, 170 nm	50
I-16	Image en microscopie électronique à transmission d'un colloïde d'argent synthétisé par la méthode de Lee et Meisel	50
I-17	Spectres SERS des mononucléotides dAMP, dGMP, dTMP, dCMP et dUMP	52
I-18	Spectres SERS d'adénine, comparé à ceux d'une séquence simple- et double-brin d'ADN appelée SN5	52
I-19	Méthode de détection d'ADN utilisée par Zhang et al. (2011).	54
I-20	Structures 2D de marqueurs SERRS pour la détection d'ADN	55
I-21	Adsorption d'oligonucléotides marqués en surface de particules d'argent colloïdal	56
I-22	Spectres SERRS de séquences d'ADN marqué en concentration 10^{-8} M par 8 différents marqueurs : ROX, TAMRA, R6G, HEX, FAM, TET, Cy3 et Cy5	57
I-23	a) Principe de détection SERRS d'un oligonucléotide marqué adsorbé en surface des particules d'un colloïde d'argent ; b) Courbes de calibration pour la détection d'oligonucléotides marqués par 1 molécule de Rhodamine 6G et par une molécule de HEX, dans l'eau ou dans le surfactant Tween	58
I-24	Spectres SERRS des marqueurs R6G, HEX ainsi que d'un mélange des 2	59
I-25	Méthode de détection spécifique d'ADN simple-brin utilisée par Graham et al., 2008	60
I-26	Méthodes de détection d'ADN simple-brin reposant sur l'utilisation de balises SERRS formant une boucle d'auto-appariement	61

I-27	Détection d'ADN simple-brin par SE(R)RS. Méthode de Van Lierop 2011.	62
II-1	Structure 2D de la molécule de Spermine	74
II-2	Spectres Raman de référence du colloïde d'argent seul et de la spermine en concentration 10^{-2} M.	74
II-3	Structure 2D la sonde Rup(R6G) ₃ .	76
II-4	Comparaison entre A) un spectre SERRS de Rhodamine 6G seule et B) un spectre SERRS de la sonde Rup(R6G) ₃ utilisée dans cette étude.	77
II-5	Géométrie de mesure utilisée	79
II-6	Stabilité temporelle du signal SERRS d'un oligonucléotide marqué par de la rhodamine (Graham 2000)	80
II-7	Contenants testés	81
II-8	Stabilité au cours du temps du signal SERRS d'un échantillon de Rup(R6G) ₃ en concentration $8,7 \times 10^{-7}$ M dans différents contenants	81
II-9	Spectres Raman des matières plastiques analysées pour choisir un contenant à usage unique	83
II-10	Spectres SERRS de Rup(R6G) ₃ obtenus pour des concentrations allant de $8,7 \times 10^{-7}$ M à $8,7 \times 10^{-10}$ M, protocole standard	84
II-11	Spectres SERRS obtenus pour des concentrations allant de $8,7 \times 10^{-11}$ M à $3,9 \times 10^{-12}$ M.	86
III-1	Evolution en fonction de T max du signal SERRS représenté comme l'aire A_{1650} normalisée à celle à température ambiante.	100
III-2	Réduction de l'adsorption non-spécifique par ajout de Tween 20 dans les milieux d'hybridation et de lavage	104
III-3	Spectres SERRS obtenus en utilisant le protocole optimisé incluant l'utilisation de Tween 20	106
III – 4	Effet de la salinité du milieu de lavage sur l'hybridation non-spécifique.	107
IV-1	Principe de détection non-enzymatique d'ADN double-brin utilisé par Hill et al. (2007)	111
VI-1	Principe d'amplification cyclique appliqué à la méthode Hybridation-SERRS.	161
A1 – 1	Absorbance des colloïdes d'or et d'argent utilisés lors de notre étude	167
A1 – 2	Utilisation de billes d'or fonctionnalisées en tant que sonde de détection dans la méthode Hybridation-SERRS	167
A1-3	Amplification du signal SERRS final par utilisation de nanoparticules d'or greffées. a) sans dépôt d'argent; b) avec dépôt d'argent	169
A2-1	Analyse par la méthode Hybridation-SERRS de molécules ne différant que d'une ou 2 bases.	173
A2-2	Effet d'une hausse de température du milieu de lavage sur la spécificité de la méthode de détection	176
A2-3	Résultats Hybridation-SERRS obtenus pour quelques combinaisons de salinité	177
A2-4	Influence du nombre d'étapes de lavage sur la spécificité de la méthode	178

PARTIE 2

Figure	p.
I-1	Exemples de microfossiles (d'après Lemelle 2008, Javaux 2010 et Schopf 2005) 201
I-2	a) Microfossiles « présumés » trouvés dans les cherts de l'Apex (3,465 Ga) 202 b) Gobules de carbonates observés par McKay (1996) dans la météorite ALH 84001.
I-3	A) Compositions isotopiques d'inclusions d'apatite dans les a. roches sédimentaires de Roebourne, craton de Pilbara, Australie, > 3.25 Ga ; b. BIF d'Isua, Groënland, > 3.7 Ga ; c. BIF de l'île d'Akilia, Groënland, > 3.8 Ga ; d. Variations isotopiques du carbone dans la nature (extrait de Mojzsis et al., 1996) ; B) Images de microscopie électronique à balayage en mode électrons rétrodiffusés des roches sédimentaires d'Isua analysées par Rosing et al. (1999). 204
I-4	Chronologie des premiers milliards d'années de la Terre. 205
I-5	Environnement Hadéen modèle d'après Russell et al. (1997). 207
I-6	Comparaison entre une molécule de ANP (ici 2,4 diaminobutanoic ANP) et une molécule d'ARN. B = base azotée. (Strasdeit 2005)) (PNA = Peptidic nucleic acid) 208
I-7	A) Modèles de croissance crustale (reproduit d'après Taylor et McLennan, 1985) ; B) Taux de croissance crustale (orange) et distribution temporelle des âges U-Pb des zircons (rouge) 209
I-8	Genèse des magmas dans un contexte de subduction à l'Archéen et à l'actuel 211
I-9	Concentrations atmosphériques en CO ₂ nécessaires pour compenser un soleil jeune moins lumineux 213
I-10	Evolution de la température océanique d'après les données isotopiques en O et Si de Cherts de 3.5 à 0.5 Ga 214
I-11	Diagramme P(CO ₂) – pH plaçant les océans actuel et primitif 215
I-12	Comparaison des 2 types de champs hydrothermaux. a) fumeur noir ; b) fumeur blanc (Lost City, photo : Kelley) ; c) températures et pH des fluides hydrothermaux 216
I-13	Bilan des conditions géologiques et environnementales à l'Hadéen/Archéen 219
I-14	Nucléotide formé par la synthèse de Powner et al. (2009). 224
I-15	a) Interaction des bases azotées avec la surface de montmorillonite (d'après Mignon et al., 2009). b) interaction d'un brin d'ARN avec la surface de la montmorillonite via l'interaction 'base azotée-cation-surface' 228
I-16	a) Adsorption de séquences d'ARN par un « pont » de cations ; b) Quantités d'ADN adsorbées sur la montmorillonite en fonction de la concentration en cation (Na ⁺ ou Ca ²⁺) 229
I-17	Nucléotides activés utilisés pour les réactions d'oligomérisations d'ARN (en présence de montmorillonite ou non) 230
I-18	Mécanisme proposé par Aldersley et al. (2011) pour la formation des liaisons phosphodiester par catalyse acido-basique au sein de l'espace interfoliaire de 232

	la montmorillonite	
I-19	Exemples de phyllosilicates représentatifs des différentes structures possibles.	233
I-20	Structures des différentes variétés de serpentines	235
I-21	Relations Pression-Température possible entre lizardite et fibres de chrysotile de rayon variable	235
I-22	Sites d'adsorption disponibles pour un feuillet de montmorillonite pour illustrer le cas général des smectites	237
II-1	Structure 2- et 3-D des nucléotides étudiés. Les structures 3D ont été réalisées avec le logiciel Crystal Maker.	246
II-2	Images MET des suspensions de SWy2 et SAz1 utilisées lors de cette étude	250
II-3	Dérivée d'une isotherme d'adsorption expérimentale type (Argon à 77K, surface de kaolinite). Elle est décomposée en trois types de sites A, B et C.	253
II-4	Modes de coagulation des particules d'argiles en suspension	254
II-5	Modèle de la double-couche électrique et définition du potentiel zéta : cas d'une particule négativement chargée	258
II-6	Evolution du potentiel zeta des phyllosilicates étudiés en fonction du pH à différentes forces ioniques	259
II-7	Exemple de diffractogramme obtenu pour un échantillon de nontronite NAu1 sur portoir en silicium. Le plan d (001) domine le signal.	261
II-8	Spectromètre Nanodrop utilisé, et pic d'absorption à 260 nm.	263
III-1	Isothermes d'adsorption obtenues sur les minéraux étudiés.	270
III-2	Isothermes d'adsorption de GMP et CMP sur 8 phyllosilicates.	271
III-3	Evolution de l'adsorption de GMP en fonction de la salinité	273
III-4	Evolution de l'adsorption de dGMP et GMP en fonction du pH	274
III-5	Isothermes d'adsorption de GMP sur les surfaces de SWy2 (bleu) et NAu1 (rouge) à pH 2.3	275
III-6	Evolution de l'adsorption de GMP et CMP à pH naturel (= pH 6) en fonction de la température.	276
III-7	Evolution de l'adsorption de GMP (triangles vides) et dGMP (triangles pleins) en fonction de la température à pH fixé à 2.5	277
III-8	Spectre IR d'un échantillon de pyrophyllite après adsorption d'AMP	278
III-9	Diffractogrammes de la nontronite NAu1 avant et après adsorption de GMP ou dGMP à pH naturel et à pH 2,5	279
IV-1	Isothermes d'adsorption en fonction de C_{eq}/C_{sol} , concentration d'équilibre normalisée par rapport à la solubilité du nucléotide.	316
IV-2	Adsorption de GMP et CMP normalisée à la surface totale.	317
IV-3	Adsorption de GMP et CMP normalisée à la surface latérale	319
IV-4	Adsorption de GMP et CMP normalisée à la surface latérale : comparaison des argiles gonflantes avec les argiles non-gonflantes et les serpentines	319
IV-5	Adsorption par échange de ligand : exemple de l'adsorption de GMP sur la pyrophyllite	320
IV-6	Mécanismes proposés pour l'adsorption de GMP et dGMP sur les faces latérales d'un feuillet de pyrophyllite	321
IV-7	Structures du chrysotile et de l'UMP, et mécanismes d'adsorption possibles	322

Liste des tableaux

PARTIE 1

Tableau		p.
I-1	Exemples de biomarqueurs lipidiques, ainsi que leur provenance	16
I-2	Comparaison des différentes méthodes de séquençage haut-débit	28
I-3	Longueur d'onde d'absorption maximale, et limites de détection SERRS d'une série de marqueurs utilisés dans l'analyse d'ADN marqué.	58
II-1	Attributions des pics SERRS de la Rhodamine 6G les plus intenses	78
II-2	Récapitulatif des protocoles de préparation testés	85
A1 – 1	Séquences utilisées lors des tests d'amplification du signal	166
A2 – 1	Séquences utilisées lors des tests d'augmentation de spécificité de la méthode. Les mismatches sont représentées en rouge	174
A2-2	Combinaisons de salinité de milieux d'hybridation et de lavages testées dans cette étude	177

PARTIE 2

Tableau		p.
I-1	Minéraux des roches volcano-sédimentaires archéennes. (d'après Papineau 2010)	220
I-2	Liste non exhaustive d'études d'adsorption des acides nucléiques sur les surfaces minérales.	226
I-3	Liste non exhaustive d'études réalisées sur la polymérisation des acides nucléiques catalysée par les surfaces minérales	231
II-1	Caractéristiques des nucléotides étudiés. Le groupe phosphate se protone une seconde fois <pH 1 pour tous les nucléotides	247
II-2	Caractéristiques des phyllosilicates étudiés.	248
II-3	Dimensions en nm des argiles gonflantes mesurées par MET.	250
II-4	Surfaces spécifiques obtenues par volumétrie point par point et par volumétrie basse pression pour Pyr., Chlor., Liz. et Chrys.	253
II-5	Surfaces spécifiques calculées pour les argiles gonflantes	256
II-6	Capacités d'échange cationique des phyllosilicates étudiés.	257
III-1	Récapitulatif des isothermes d'adsorption réalisées à pH naturel (<i>i.e.</i> 6.5 environ)	269
III-2	Recouvrement maximal en fonction du pH pour les argiles gonflantes N _{Au} 1 et S _{Wy} 2 en pourcentage de la surface totale réelle en suspension	275

